

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. Juli 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/058956 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/02, (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 LUDWIGSHAFEN (DE).  
G01N 33/50, C12N 15/82

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/014379

(22) Internationales Anmeldedatum:  
17. Dezember 2003 (17.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 61 192 0 20. Dezember 2002 (20.12.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: EHRHARDT, Thomas [DE/DE]; Maulbronner Hof 49, 67346 Speyer (DE). REINDL, Andreas [DE/DE]; Brunhildestr. 24, 68199 Mannheim (DE). FREUND, Annette [DE/DE]; Römerweg 17c, 67117 Limburgerhof (DE). SCHMIDT, Ralf-Michael [DE/DE]; Am Schlossgarten 9 d, 67489 Kirmweiler (DE). DEIST, Kirsten [DE/DE]; Akazienweg 20, 06449 Westdorf (DE). SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). STITT NIGEL, Marc [DE/DE]; Grosse Weinmeisterstr. 22a, 14469 Potsdam (DE). LEIN, Wolfgang [DE/DE]; Geschwister-Scholl-Str. 95, 14471 Potsdam (DE). BÖRNKE, Frederik [DE/DE]; Am heiligen Brunnen 2, 06484 Quedlinburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MALATE DEHYDROGENASE AS A TARGET FOR HERBICIDES

(54) Bezeichnung: MALAT DEHYDROGENASE ALS TARGET FÜR HERBIZIDE

(57) Abstract: The invention relates to the use of malate dehydrogenase, the absence of which causes growth retardation and chlorotic leaves and which is coded by the nucleic acid sequence SEQ ID NO:2 or a functional equivalent thereof, as a target for herbicides. Novel nucleic acid sequences comprising SEQ ID NO:2 and functional equivalents of SEQ ID NO:2 are provided in said framework. The invention also relates to the use of said malate dehydrogenase and the functional equivalents thereof in a method for identifying compounds having a herbicidal or growth-regulating effect and the use of the compounds identified via said method as herbicides or growth regulators.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Malat Dehydrogenase, welches bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen sowie chlorotische Blätter bedingt und durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 oder ein funktionelles Äquivalent dieser Nukleinsäuresequenz kodiert wird, als Target für Herbizide. In diesem Rahmen werden neue Nukleinsäuresequenzen umfassend die SEQ ID NO:2 sowie funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:2 bereitgestellt. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorstehend genannten Malat Dehydrogenase sowie deren funktioneller Äquivalente in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung sowie die Verwendung dieser über das Verfahren identifizierten Verbindungen als Herbizide oder Wachstumsregulatoren.

WO 2004/058956 A1

ERV

## Malat Dehydrogenase als Target für Herbizide

### Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Malat Dehydrogenase, welches bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen sowie chlorotische Blätter bedingt und durch die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 oder ein funktionelles Äquivalent dieser Nukleinsäuresequenz kodiert wird, als Target für Herbizide. In diesem Rahmen werden neue Nukleinsäuresequenzen umfassend die SEQ ID NO:2 sowie funktionelle Äquiva-  
10 lente der SEQ ID NO:2 bereitgestellt. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorstehend genannten Malat Dehydrogenase sowie deren funktio-  
neller Äquivalente in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbi-  
zider oder wachstumsregulatorischer Wirkung sowie die Verwendung dieser über das  
Verfahren identifizierten Verbindungen als Herbizide oder Wachstumsregulatoren.

15 Das grundlegende Prinzip, Herbizide über Inhibierung eines definierten Targets zu identifizieren ist bekannt (z.Bsp. US 5,187,071, WO 98/33925, WO 00/77185). Generell besteht ein großer Bedarf, Enzyme zu detektieren, welche neue Targets für Herbizide darstellen könnten. Gründe hierfür sind auftretende Resistenzproblematiken von an  
20 bereits bekannten Targets wirkenden herbiziden Wirkstoffen und das ständige Bemü-  
hen neue herbizide Wirkstoffe zu identifizieren, die sich durch einen möglichst breiten  
Wirkungsbereich, ökologische und toxikologische Verträglichkeit und/oder geringe  
Aufwandmengen auszeichnen.

25 Die Detektion von neuen Targets ist in der Praxis mit großen Schwierigkeiten verbun-  
den, da die Hemmung eines Enzyms, das Bestandteil eines Stoffwechselweges ist,  
häufig das Wachstum der Pflanze nicht weiter beeinflusst. Dies kann daran liegen,  
dass die Pflanze auf alternative Stoffwechselwege ausweicht, deren Existenz nicht  
bekannt ist, oder dass das inhibierte Enzym nicht limitierend für den Stoffwechselweg  
30 ist. Ferner zeichnen sich pflanzliche Genome durch eine große funktionelle Redundanz  
aus. Im Genom von Arabidopsis thaliana liegen funktional äquivalente Enzyme im  
Vergleich zu Insekten oder Säugern häufiger in Genfamilien vor (Nature, 2000,  
408(6814):796-815). Diese Annahme wird experimentell bestätigt durch die Tatsache,  
dass grosse Gen-Knock-out-Programme durch T-DNA- oder Transposoninsertion in  
35 Arabidopsis bisher weniger ausgeprägte Phänotypen lieferten als erwartet (Curr. Op.  
Plant Biol. 4, 2001, pp.111-117).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, neue Targets zu identifi-  
zieren, die für das Wachstum von Pflanzen essentiell sind bzw. deren Inhibierung für  
40 die Pflanze zu einem verminderten Wachstum führen, sowie Verfahren bereitzustellen,  
welche zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider und/oder wachstumsregula-

torischer Wirkung geeignet sind.

Die Aufgabe wurde gelöst durch die Verwendung von Malat Dehydrogenase in einem Verfahren zur Identifizierung von Herbiziden.

5

An dieser Stelle werden nun weitere der in der Beschreibung verwendeten Begriffe definiert.

10

"Affinitäts-Tag": Bezeichnet ein Peptid oder Polypeptid, dessen kodierende Nukleinsäuresequenz mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz direkt oder mittels eines Linkers über gängige Klonierungstechniken fusioniert werden kann. Das Affinitäts-Tag dient zur Isolierung, Anreicherung und/oder gezielten Aufreinigung des rekombinanten Zielproteins mittels Affinitäts-Chromatographie aus Gesamtzellextrakten. Der oben erwähnte Linker kann vorteilhaft eine Protease-Schnittstelle (z.B. für Thrombin oder Faktor Xa) enthalten, wodurch das Affinitäts-Tag bei Bedarf vom Zielprotein abgespalten werden kann. Beispiele für gängige Affinitäts-Tags sind das "His-Tag" z.B. von Quiagen, Hilden, "Strep-Tag", das "Myc-Tag" (Invitrogen, Carlsberg), das aus einer Chitin bindenden Domäne und einem Intein bestehende Tag von New England Biolabs, das Maltose-bindende Protein (pMal) von New England Biolabs und das sogenannte CBD-Tag von Novagen. Der Affinitäts-Tag kann dabei am 5'- oder 3'-Ende der kodierenden Nukleinsäuresequenz mit der für das Zielprotein kodierenden Sequenz angebracht sein.

15

20

25

"Biologische Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase": Dieser Begriff beschreibt im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass durch die Präsenz der glyoxysomalen Malat Dehydrogenase Wachstums- und Überlebensfähigkeit vermittelt wird. Wird die Aktivität eines Proteins mit der biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase gehemmt, so führt dies zu einem verminderten Wachstum, einem Wachstumsstillstand oder einem Absterben der Pflanze.

30

35

"Enzymatische Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase": Der Begriff enzymatische Aktivität beschreibt die Fähigkeit eines Enzyms, ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln. Die enzymatische Aktivität kann in einem sogenannten Aktivitätstest über die Zunahme des Produktes, die Abnahme des Substrates (oder Eduktes) oder die Abnahme eines spezifischen Cofaktors oder über eine Kombination aus mindestens zwei der vorstehend genannten Parameter in Abhängigkeit einer definierten Zeitspanne bestimmt werden. "Enzymatische Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase" bezeichnet hier die Fähigkeit eines Enzyms, eine von der glyoxysomalen Malat Dehydrogenase katalysierte Reaktion ebenfalls zu katalysieren.

40

“Expressionskassette”: Eine Expressionskassette enthält eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft mit mindestens einem genetischen Kontrollelement, wie einem Promotor, sowie vorteilhaft mit einem weiteren Kontrollelement, wie einem Terminator. Die Nukleinsäuresequenz der Expressionskassette kann beispielsweise eine genomische oder eine komplementäre DNA-Sequenz oder eine RNA-Sequenz sowie halb- oder vollsynthetische Analoga davon sein. Diese Sequenzen können in linearer oder zirkulärer Form, extra-chromosomal oder integriert in das Genom vorliegen. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen werden oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Auch artifizielle Nukleinsäuresequenzen sind hierbei geeignet, solange sie die Expression eines durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierten Polypeptides mit der enzymatischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase, vorzugsweise der biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase in einer Zelle oder einem Organismus ermöglichen. Beispielsweise können synthetische Nukleotid-Sequenzen erzeugt werden, die bezüglich der Kodon-Nutzung des von den zu transformierenden Organismen optimiert wurden.

Alle vorstehend erwähnten Nukleotid-Sequenzen sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragment-Kondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleotidbausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise in bekannter Weise nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente so manipuliert werden, dass eine Nukleotid-Sequenz mit korrekter Leserichtung und korrektem Leseraster erhalten wird. Die Verbindung der Nukleinsäure-Fragmente untereinander erfolgt über allgemeine Klonierungstechniken wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994) beschrieben sind.

“Funktionelle Verknüpfung”: Unter einer funktionellen oder operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung regulativer Sequenzen bzw. genetischer Kontrollelemente derart, daß jede der regulativen Sequenzen bzw. jedes der genetischen Kontrollelemente ihre Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz

bestimmungsgemäß erfüllen kann.

5 “Funktionelle Äquivalente” beschreiben hier Nukleinsäuresequenzen, die unter Standardbedingungen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 oder Teilen der SEQ ID NO:2 hybridisieren und befähigt sind, die Expression eines Polypeptides mit der enzymatischen, vorzugsweise biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase in einer Zelle oder einem Organismus zu bewirken.

10 Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 10-50 bp, vorzugsweise 15-40 bp beispielsweise der konservierten oder sonstigen Bereiche, die über Vergleiche mit anderen verwandten Genen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit einer Länge von 100-500 bp oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach  
15 der verwendeten Nukleinsäure/Oligonukleotid, der Länge des Fragmentes oder der vollständigen Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart, d.h. DNA oder RNA, für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

20 Unter Standardhybridisierungsbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wässrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x  
25 SSC, 50% Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen  
30 Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50% in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise Sambrook et al., “Molecular Cloning”, Cold Spring Harbor Laboratory,  
35 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds),  
40 1985, “Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach”, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Ap-

proach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

- Unter einem funktionellen Äquivalent der SEQ ID NO:2 versteht man weiterhin auch Nukleinsäuresequenzen die mit der SEQ ID NO:2 bis zu einem definierten Prozentsatz
- 5 homolog bzw. identisch sind und ferner insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit der enzymatischen, vorzugsweise biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase kodieren.
- 10 Es werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen erhält. Beispielhaft können solche Modifikationen durch dem Fachmann geläufige Techniken, wie "Site Directed Mutagenesis", "Error Prone PCR", "DNA-shuffling" (Nature 370, 1994, pp.389-391) oder "Staggered Extension Process"
- 15 (Nature Biotechnol. 16, 1998, pp.258-261) erzeugt werden. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die Einfügung weiterer Restriktionsenzymschnittstellen, die Entfernung von DNA zur Verkürzung der Sequenz, der Austausch von Nukleotiden zur Codon-Optimierung oder das Hinzufügen weiterer Sequenzen sein. Proteine, die über modifizierte Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, müssen trotz abweichender
- 20 Nukleinsäuresequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen.

- Der Begriff des funktionellen Äquivalents kann sich auch auf das durch die entsprechende Nukleinsäuresequenz kodierte Aminosäuresequenz beziehen. In diesem Fall beschreibt der Begriff funktionelles Äquivalent ein Protein, dessen Aminosäuresequenz
- 25 mit der SEQ ID NO:3 bis zu einem definierten Prozentsatz identisch bzw. homolog ist.

- Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch adaptierte Nukleinsäuresequenzen bzw. die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen.
- 30

- "Genetische Kontrollsequenz" beschreibt Sequenzen, die einen Einfluss auf die Transkription und gegebenenfalls Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in prokaryotischen oder eukaryontischen Organismen haben. Beispiele hierfür sind Promotoren, Terminatoren oder sogenannte "enhancer" Sequenzen. Zusätzlich zu diesen
- 35 Kontrollsequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch so modifiziert worden sein, dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression des Zielgens modifiziert, also erhöht oder erniedrigt wurde.
- 40 Die Auswahl der Kontrollsequenz erfolgt abhängig vom Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus. Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-

untranslatierte Region, Introns oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen. Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, sowie die Chromatinstruktur beeinflussende Sequenzen (z.B. Matrix attachment regions (MAR's)) die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135), Kälte- und Trockenstress (Plant Cell 1994, (6): 251-264) und Hitzestress (Molecular & General Genetics, 1989, 217(2-3): 246-53) beschrieben.

"Homologie" zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptidsequenzen wird durch die Identität der Nukleinsäuresequenz/Polypeptidsequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge definiert, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus BESTFIT (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA unter Einstellung folgender Parameter für Polypeptide

Gap Weight: 8	Length Weight: 2
Average Match: 2,912	Average Mismatch: -2,003

und folgender Parameter für Nukleinsäuren

Gap Weight: 50	Length Weight: 3
Average Match: 10.000	Average Mismatch: -9.000

berechnet wird.

Anstelle des Begriff "homolog" oder "Homologie" wird im Folgenden auch gleichbedeutend der Begriff Identität verwendet.

"Mutationen" von Nuklein- oder Aminosäuresequenzen umfassen Substitutionen (=Ersetzungen), Additionen (Hinzufügung), Deletionen (Löschung), Inversion (Veränderungen) oder Insertionen (Einfügungen) eines oder mehrerer Nukleotidreste, wodurch sich auch die entsprechende Aminosäuresequenz des Zielproteins mittels Substitution, Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren verändern kann, wobei jedoch insgesamt die funktionellen Eigenschaften des Zielproteins im wesentlichen beibehalten werden.

- "Natürliche genetische Umgebung" meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an 5'- oder 3'-
- 5 Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 100 bp, besonders bevorzugt mindestens 500 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, am meisten bevorzugt mindestens 5000 bp.
- "Pflanzen" im Sinne der Erfindung sind Pflanzenzellen, -gewebe, -organe oder ganzen
- 10 Pflanzen wie Samen, Knollen, Blüten, Pollen, Früchte, Sämlinge, Wurzeln, Blätter, Stengel oder sonstige Pflanzenteile zu verstehen. Außerdem ist unter Pflanzen Vermehrungsmaterial wie Samen, Früchte, Sämlinge, Stecklinge, Knollen, Schnitte oder Wurzelstöcke zu verstehen.
- 15 "Reaktionszeit" bezeichnet die Zeit, die man für die Durchführung eines Testes zur Ermittlung der enzymatischen Aktivität bis zum Erhalt einer signifikanten Aussage über eine enzymatische Aktivität benötigt und hängt sowohl von der spezifischen Aktivität des im Test eingesetzten Proteins als auch von der verwendeten Methode und der Empfindlichkeit der verwendeten Geräte ab. Dem Fachmann ist die Ermittlung der
- 20 Reaktionszeiten bekannt. Bei auf photometrischen Methoden basierenden Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung liegen die Reaktionszeiten beispielsweise im allgemeinen zwischen > 0 bis 120 Minuten.
- "Rekombinante DNA" beschreibt eine Kombination von DNA-Sequenzen herstellbar
- 25 durch rekombinante DNA-Technologie.
- "Rekombinate DNA-Technologie": allgemein bekannte Techniken zur Fusionierung von DNA-Sequenzen (z.B. beschrieben in Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- 30 "Replikationsursprünge" gewährleisten die Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in Mikroorganismen und Hefen z.B. der pBR322 ori oder der P15A ori in E. coli (Sambrook et al.: "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und
- 35 der ARS1 ori in Hefe (Nucleic Acids Research, 2000, 28(10): 2060-2068).
- "Reportergene" kodieren für leicht quantifizierbare Proteine. Über Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung (Eigenfarbe) oder Enzymaktivität kann mittels dieser Gene eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes vorgenommen werden. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn
- 40



E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Gerdes HH and Kaether C, FEBS Lett. 1996; 389(1):44-47; Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffel SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997), die Chloramphenicolacetyltransferase, eine Luziferase (Giacomin, Plant Sci 1996, 116:59-72; Scikantha, J Bact 1996, 178:121; Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992 10:324-414), sowie Luziferasegene, im allgemeinen die  $\beta$ -Galactosidase oder die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907) oder das Ura3-Gen.

"Selektionsmarker" verleihen eine Resistenz gegen Antibiotika, oder andere toxische Verbindungen: Beispielhaft zu nennen seien hier das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das eine Resistenz gegen die Aminoglycosid-Antibiotika Neomycin (G 418), Kanamycin, Paromycin (Deshayes A et al., EMBO J. 4 (1985) 2731-2737), das sul Gen kodierend für eine mutierte Dihydropteroat Synthase (Guerineau F et al., Plant Mol Biol. 1990; 15(1):127-136), das Hygromycin B Phosphotransferase-Gen (Gen Bank Accession NO: K 01193) und das shble Resistenzgen, das eine Resistenz gegen die Bleomycin Antibiotika wie z.B. Zeocin verleiht. Weitere Beispiele für Selektionsmarker-Gene sind Gene, die eine Resistenz gegen 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder Phosphinotricin etc. verleihen oder solche, die eine Antimetaboliten-Resistenz verleihen, zum Beispiel das dhfr-Gen (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994) 142-149). Geeignet sind ferner Gene wie trpB oder hisD (Hartman SC and Mulligan RC, Proc Natl Acad Sci U S A. 85 (1988) 8047-8051). Geeignet ist auch das Gen der Mannose-Phosphat Isomerase (WO 94/20627), das ODC (Ornithin-Decarboxylase) Gen (McConlogue, 1987 in: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Hrsg.) oder die Deaminase aus Aspergillus terreus (Tamura K et al., Biosci Biotechnol Biochem. 59 (1995) 2336-2338).

"Transformation" beschreibt einen Prozess zur Einführung heterologer DNA in eine pro- oder eukaryontische Zelle. Mit einer transformierten Zelle ist nicht nur das Produkt des Transformationsprozesses an sich beschrieben, sondern auch alle transgenen Nachkommen des durch die Transformation hergestellten transgenen Organismus

"Target/Target Protein": ein Polypeptid codiert über die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, welches ein Enzym im klassischen Sinne sein kann oder z.B. ein Strukturprotein, ein für Entwicklungsprozesse relevantes Protein, Regulationsproteine wie Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen, Rezeptoren, Untereinheiten von Kanälen, Transportproteine, regulatorische Untereinheiten die einem Enzymkomplex eine substrat- oder Aktivitätsregulation verleihen. Allen Targets oder Wirkorten gemein ist dabei, dass deren funktionale Anwesenheit essentiell für das Überleben oder die normale Entwicklung und das Wachstum sind.

“Transgen”: Bezogen auf eine Nukleinsäuresequenz, eine Expressionskassette oder einen Vektor enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einen Organismus transformiert mit der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor beschreibt der Ausdruck transgen alle solche durch gentechnische Methoden hergestellten Konstruktionen, in denen sich entweder die Nukleinsäuresequenz des Zielproteins oder eine mit der Nukleinsäuresequenz des Zielproteins funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz oder eine Kombination der vorstehend genannten Möglichkeiten sich nicht in ihrer natürlichen genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden. Die Modifikation kann hier beispielsweise über Mutation eines oder mehrerer Nukleotidreste der entsprechenden Nukleinsäuresequenz erreicht werden.

Malat Dehydrogenase katalysiert die reversible, Pyridinnukleotid-abhängige Umsetzung von Oxalacetat und Malat. Aufgrund der Umsetzung dieser bedeutenden Metabolite des Primärstoffwechsels hat die von der Malat Dehydrogenase katalysierte Reaktion für diverse Prozesse eine Bedeutung (Review in Faske et al. 1997, Plant Physiology 115, 705-715). NAD<sup>+</sup>-abhängige Malat Dehydrogenasen sind in Mitochondrien, Microbodies wie Peroxysomen oder Glyoxysomen und dem Zytosol sowie in Wurzelknöllchen zu finden, während Chloroplasten eine NADP<sup>+</sup>-abhängige Malat Dehydrogenase enthalten, die lichtabhängig reguliert wird. Malat Dehydrogenasen werden in Arabidopsis durch eine Genfamilie codiert. Die einzelnen Isoformen enthalten spezifische N-terminale Transitsequenzen für einen Transport in die Chloroplasten, Mitochondrien und Microbodies. Ferner finden sich Sequenzen für Malat Dehydrogenasen, die aufgrund fehlender Transitpeptide vermutlich im Zytosol verbleiben. Für Malat Dehydrogenasen codierende Sequenzen wurden aus verschiedenen C3- und C4-Pflanzen isoliert (siehe Miller et al. 1998 Plant Journal 15, 173-184). Bekannt sind für glyoxysomalen Malat Dehydrogenase kodierende Nukleinsäuresequenzen sowie Proteinsequenzen aus Wassermelone (P19446, Swissprot; Identität zur SEQ ID NO:2 = 77,5%; Identität zur Seq ID NO:3 = 85,4%), Gurke, Arabidopsis, Soja und Reis.

Die Antisense-Inhibierung einer cytosolischen Malat Dehydrogenase in Kartoffel auf bis zu 40% Restaktivität führte zu keinen ausgeprägten Wachstumsphänotypen und keinem verringertem Knollenertrag (Jenner et al. 2001, Plant Physiology 126, 1139-1149). Nach Faske et al. (1997, Plant Physiology 115, 705-715) beeinflusst die Verringerung der Expression einer plastidären Malat Dehydrogenase aus Tabak durch Antisense und Cosuppression in transgenen Tabakpflanzen selbst bei stark verringerter Malat Dehydrogenase-Expression (< 20% Restaktivität) die Vitalität der transgenen Pflanzen nicht. Beobachtet wurde nur ein geringe Veränderungen bezüglich der Wachstumsparameter (Frischgewicht, Trockengewicht). Die versuchte Überexpression einer plastidären Malat Dehydrogenase aus Sorghum in der C4-Pflanze Flaveria führte durch Cosuppression zur drastischen Inhibierung der Malat Dehydrogenase-Aktivität auf 5-50%

Restaktivität (Trevanion et al. 1997, Plant Physiology 113, 1153-1165) ohne signifikante Einflüsse auf die Vitalität der Pflanzen.

5 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise gefunden, dass Pflanzen, in denen gezielt glyoxysomale Malat Dehydrogenase verringert wurde, Phänotypen aufwiesen, die mit durch Herbizidapplikation erzeugten Phänotypen vergleichbar sind. Beobachtet wurden drastische Wachstumsretardierungen und Schädigungen wie Chlorosen und Nekrosen.

10 Obgleich cytosolische und plastidäre Malat Dehydrogenase für Pflanzen nicht essentiell ist, können diese Enzyme prinzipiell auch zur Bestimmung von Inhibitoren der glyoxysomalen Malat Dehydrogenase herangezogen werden, da die durch die cytosolische und plastidäre Malat Dehydrogenase katalysierte Reaktion die gleiche ist wie die durch die glyoxysomalen Malat Dehydrogenase katalysierte.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Malat Dehydrogenase in einem Verfahren zur Identifizierung von Herbiziden, vorzugsweise von pflanzlicher Malat Dehydrogenase, besonders bevorzugt von pflanzlicher Malat Dehydrogenase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz umfassend

- 20
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
  - b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
  - 25 c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
  - 30 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% aufweist, ableiten läßt,

35 wobei sich die funktionellen Äquivalente nach c) und d) sich durch eine gleiche Funktionalität auszeichnen, d.h. sie haben die enzymatische Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase.

40 Der Begriff "umfassend" oder "umfassen" bezogen auf Nukleinsäuresequenzen meint, daß die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz am 3' oder am 5' Ende zusätzliche

Nukleinsäuresequenzen enthalten kann, wobei die Länge der zusätzlichen Nukleinsäuresequenzen 500 bp am 5' und 500 bp 3' Ende der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, vorzugsweise 250 bp am 5' und 250 bp am 3' Ende nicht überschreitet, besonders bevorzugt 100 bp am 5' und 100 bp am 3' Ende.

5

Beispiele für funktionelle Äquivalente gemäß d) sind auch die pflanzlichen Nukleinsäuresequenzen codierend für Malatdehydrogenase aus

Gurke (Gen Bank Accession Number: L31900)

Arabidopsis (Gen Bank Accession Number: AC005671)

10 Soya (Gen Bank Accession Number: L01628) und

Reis (Gen Bank Accession Number: D85763)

sowie die Nukleinsäuresequenz, welche durch die Aminosäuresequenz einer Malat Dehydrogenase aus Wassermelone (Accession Number: P19446, Swissprot) codiert wird.

15

Alle vorstehend genannten Sequenzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

20

Das erfindungsgemäße funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:3 gemäß d) weist eine Homologie mit der SEQ ID No:3 von mindestens 63%, 64%, 65%, 66% vorzugsweise mindestens 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74% vorzugsweise mindestens 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80% bevorzugt mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

25

Besonders bevorzugt ist die Verwendung von glyoxysomaler Malat Dehydrogenase in einem Verfahren zur Identifizierung von Herbiziden kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz umfassend

30

a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

35

c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

40

d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen

Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66% aufweist, ableiten läßt.

5 Die funktionellen Äquivalente nach d) zeichnen sich durch eine gleiche Funktionalität aus, d.h. sie haben die biologische Funktion einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase.

Die oben genannten Nukleinsäuresequenzen stammen vorzugsweise aus einer Pflanze.

10 Das erfindungsgemäße funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:3 gemäß d) weist eine Homologie mit der SEQ ID No:3 von mindestens 66%, 67%, 68% vorzugsweise mindestens 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80% vorzugsweise mindestens 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%,  
15 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Weiterhin werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuresequenzen beansprucht kodierend für eine pflanzliche glyoxysomalen Malat Dehydrogenase umfassend:

- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- 25 b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- 30 d) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 mit einer Identität von mindestens 79% zu der SEQ ID NO:2; oder
- 35 e) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt.

40 Ebenfalls beansprucht werden die durch die vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen kodierten Polypeptide. Die funktionellen Äquivalente nach c) und d) zeichnen

sich durch eine gleiche Funktionalität aus, d.h. sie haben die enzymatische, vorzugsweise biologische Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase.

5 Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:2 weisen eine Identität mit der SEQ ID No:2 von mindestens 79%, 80%, 81%, 82%, 83% vorzugsweise mindestens 84%, 85%, 86%, 88%, 89%, bevorzugt mindestens 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% besonders bevorzugt mindestens 96%, 97%, 98%, 99% auf.

10 Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:3 weisen eine Identität mit der SEQ ID No:3 von mindestens 87%, 88%, 89%, 89% vorzugsweise mindestens 90%, 91%, 92%, 93% bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96% besonders bevorzugt mindestens 97%, 98%, 99% auf.

15 Der im folgenden verwendete Begriff "erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen" steht für Nukleinsäuresequenzen kodierend für eine Malat Dehydrogenase, vorzugsweise für Nukleinsäuresequenzen kodierend für eine pflanzliche Malat Dehydrogenase, besonders bevorzugt für Nukleinsäuresequenzen kodierend für eine pflanzliche Malat Dehydrogenase umfassend

20 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

25 c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

30 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% aufweist, ableiten läßt,

35 ganz besonders bevorzugt für Nukleinsäuresequenzen kodierend für eine pflanzliche glyoxysomale Malat Dehydrogenase umfassend

a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

40

- b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- 5 c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- 10 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66% aufweist, ableiten läßt.

Die durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierten Polypeptide mit der enzymatischen, vorzugsweise biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase werden im folgenden der Einfachheit halber als "MDH" bezeichnet. Der Begriff "Malat Dehydrogenase" bezeichnet jedes Protein/Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Malat Dehydrogenase.

20 Glyoxysomale MDHs verursachen in reduzierter Menge Wachstumsretardierungen sowie nekrotische und chlorotische Blätter in Pflanzen.

Die Genprodukte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellen neue Targets für Herbizide dar, welche die Bereitstellung neuer Herbizide zur Bekämpfung unerwünschter Pflanzen ermöglichen. Des weiteren stellen die Genprodukte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellen neue Targets für Wachstumsregulatoren dar, welche die Bereitstellung neuer Wachstumsregulatoren zur Regulation des Wachstums von Pflanzen ermöglichen.

30 Unter unerwünschten Pflanzen sind im weitesten Sinne alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind, zum Beispiel:

35 Dikotyle Unkräuter der Gattungen: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus*, *Taraxacum*.

40 Monokotyle Unkräuter der Gattungen: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*,

*Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus, Apera.*

Die SEQ ID NO:2 oder Teile der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen können für die Herstellung von Hybridisierungs sonden verwendet werden. Die Herstellung dieser Sonden sowie die Durchführung der Experimente ist bekannt. Sie kann zum Beispiel über die gezielte Herstellung radioaktiver oder nicht radioaktiver Sonden mittels PCR und der Verwendung von entsprechend markierten Oligonukleotiden mit anschließenden Hybridisierungsexperimenten erfolgen. Die hierfür erforderlichen Technologien sind beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) aufgeführt. Die entsprechenden Sonden können weiterhin mittels Standardtechnologien (Lit. SDM bzw. random Mutagenesis) so modifiziert werden, dass sie für weitere Zwecke eingesetzt werden können, z.B. als Sonde, die spezifisch zu mRNA sowie den entsprechenden codierenden Sequenzen hybridisiert zwecks Analyse der entsprechenden Sequenzen in anderen Organismen.

Die oben genannten Sonden können für die Detektion und Isolation von funktionellen Äquivalenten der SEQ ID NO:2 aus anderen Pflanzenspezies aufgrund von Sequenzidentitäten verwendet werden. Hierbei wird ein Teil oder die gesamte Sequenz der entsprechenden SEQ ID NO:2 als Sonde zum Screening in einer genomischen oder cDNA Bank der entsprechenden Pflanzenspezies oder in einer Computer-Recherche nach Sequenzen funktioneller Äquivalente in elektronischen Datenbanken verwendet.

Bevorzugte Pflanzenspezies sind hierbei die bereits eingangs erwähnten unerwünschten Pflanzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Expressionskassetten enthaltend

- a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz umfassend
  - i. eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
  - ii. eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
  - iii. funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 mit einer Identität von mindestens 79% zu der SEQ ID NO:2;



- iv. eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 92% aufweist, ableiten läßt.
- 5 b) zusätzliche Funktionselemente; oder
- c) eine Kombination aus a) und b);
- 10 sowie die Verwendung von Expressionskassetten enthaltend
- a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz;
- 15 b) zusätzliche Funktionselemente; oder
- c) eine Kombination aus a) und b);
- 20 zur Expression einer Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH, die in vitro Testsystemen verwendet werden kann. Beide Ausführungsformen der vorstehend beschriebenen Expressionskassetten werden im folgenden als erfindungsgemäße Expressionskassette bezeichnet.
- 25 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette am 5'-Ende der kodierenden Sequenz einen Promotor und am 3'-Ende Transkriptions-Terminations-Signal und gegebenenfalls weitere genetische Kontrollsequenzen, welche mit der dazwischenliegenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft sind.
- 30 Unter den erfindungsgemäßen Expressionskassetten sind auch Analoga zu verstehen, die zum Beispiel durch eine Kombination der einzelnen Nukleinsäuresequenzen auf einem Polynukleotid (Mehrfachkonstrukte), auf mehreren Polynukleotiden in einer Zelle (Kotransformation) oder durch sequenzielle Transformation zustande kommen können.
- 35 Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen nach Punkt a) für die erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder für Vektoren enthaltend erfindungsgemäße Expressionskassetten sind beispielsweise Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, lpp-, lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-,  $\lambda$ -PR- oder im  $\lambda$ -PL-Promotor, die zur Expression einer Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH, in gram-negativen Bakterienstämmen verwendet werden können.
- 40

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den Promotoren amy und SPO2, die zur Expression der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH in gram-positiven Bakterienstämmen verwendet werden können, sowie in den Hefe- oder Pilzpromotoren AUG1, GPD-1, PX6, TEF, CUP1, PGK, GAP1, TPI, PHO5, AOX1, GAL10/CYC1, CYC1, OLC, ADH, TDH, Kex2, MFa oder NMT oder Kombinationen der vorstehend genannten Promotoren enthalten (Degryse et al., Yeast 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Romanos et al. Yeast 1992 Jun;8(6):423-88; Benito et al. Eur. J. Plant Pathol. 104, 207-220 (1998); Cregg et al. Biotechnology (N Y) 1993 Aug;11(8):905-10; Luo X., Gene 1995 Sep 22;163(1):127-31; Nacken et al., Gene 1996 Oct 10;175(1-2): 253-60; Turgeon et al., Mol Cell Biol 1987 Sep;7(9):3297-305) oder den Transkriptions-terminatoren NMT, Gcy1, TrpC, AOX1, nos, PGK oder CYC1 (Degryse et al., Yeast 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Brunelli et al. Yeast 1993 Dec9(12): 1309-18; Frisch et al., Plant Mol. Biol. 27 (2), 405-409 (1995); Scorer et al., Biotechnology (N.Y.) 12 (2), 181-184 (1994), Genbank acc. number Z46232; Zhao et al. Genbank acc number : AF049064; Punt et al., (1987) Gene 56 (1), 117-124), die zur Expression der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH in Hefestämmen verwendet werden können.

Als zur Expression in Insektenzellen geeignete genetische Kontrollsequenzen sind exemplarisch der Polyhedrin-Promotor sowie der p10-Promotor (Luckow, V.A. and Summers, M.D. (1988) Bio/Techn. 6, 47-55) zu nennen.

Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH in Zellkultur sind neben Polyadenylierungssequenzen wie z.B. aus Simian Virus 40 eukaryontische Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40.

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH in Pflanzen sind in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, LEB4, USP, STLS1, B33, NOS; FBpaseP (WO 98/18940) oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten, vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt sind Promotoren viralen Ursprungs wie der Promotor des 35S-Transkriptes des Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294; Odell et al., Nature 313 (1985), 810-812). Weitere bevorzugte konstitutive Promotoren sind zum Beispiel der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al., Plant Mol Biol 1995, 29:637-649), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991).

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor als genetische Kontrollsequenz enthalten, durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer (EP-A-0388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können ebenfalls verwendet werden.

Geeignet sind ferner Promotoren die eine gewebe- oder organspezifische Expression z.B. in Antheren, Ovarien, Blüten und Blütenorganen, Blättern, Schließzellen, Trichomen, Stengel, Leitgeweben, Wurzeln und Samen vermitteln. Ebenfalls geeignet sind hier neben den oben genannten konstitutiven Promotoren, insbesondere solche Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine Expression in Samen und pflanzlichen Embryonen steuern. Samenspezifische Promotoren sind zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200, Bustos MM et al., Plant Cell. 1989;1(9):839-53), des 2S Albumins (Joseffson LG et al., J Biol Chem 1987, 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al., Mol Gen Genet. 1989;215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al., Molecular & General Genetics 1991, 225(3):459-67) des Napin Gens (Stalberg K, et al., L. Planta 1996, 199:515-519), des Saccharosebindepoteins (WO 00/26388) oder der LeB4-Promotor (Bäumlein H et al., Mol Gen Genet 1991, 225: 121-128; Fiedler, U. et al., Biotechnology (NY) (1995), 13 (10) 1090).

Weitere als genetische Kontrollsequenzen geeignete Promotoren sind beispielsweise spezifische Promotoren für Knollen, Speicherwurzeln oder Wurzeln, wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel, der Promotor der Stärke Synthase (GBSS1) oder der Sporamin Promotor, fruchtspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtspezifische Promotor aus Tomate (EP-A 409625), fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794), blütenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-r Gens (WO 98/22593) oder spezifische Plastiden- oder Chromoplasten-Promotoren, wie beispielsweise der RNA-Polymerase Promotor (WO 97/06250) oder auch der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nr U87999) oder ein anderer No-

dien-spezifischer Promotor wie in EP-A 249676 können vorteilhaft verwendet werden.

Unter zusätzlichen Funktionselementen b) sind beispielhaft aber nicht einschränkend Reportergene, Replikationsursprünge, Selektionsmarker und sogenannte Affinitäts-  
5 Tags, fusioniert mit der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH direkt oder mittels eines Linkers optional enthaltend eine Protease-Schnittstelle zu verstehen. Weitere geeignete zusätzliche Funktionselemente sind Sequenzen, die ein Targeting in den A-poplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Peroxisom, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer  
10 Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Erfindungsgemäß sind ferner Vektoren, die mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und/oder der erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthalten.  
15

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre  
20 DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden. bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das  
25 Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt als Vektor oder den verwendeten Nukleinsäuresequenzen bestehen.

Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel  
30 16 und 17 in Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.

35 Die erfindungsgemäße Expressionskassette sowie davon abgeleitete Vektoren können zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien (z.B. der Gattung Synechocystes, Anabaena, Calothrix, Scytonema, Oscillatoria, Plectonema und Nostoc), Proteobakterium wie etwa Magnetococcus sp. MC1, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen und  
40 eukaryontischen, nicht humanen Zellen (z.B. Insektenzellen) mit dem Ziel der rekombinanten Herstellung der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH eingesetzt werden,

wobei sich die Herstellung einer geeigneten Expressionskassette nach dem Organismus, in welchen das Gen exprimiert werden soll, richtet.

Vektoren enthaltend

5

a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

10

b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

15

c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 mit einer Identität von mindestens 79% zu der SEQ ID NO:2;

20

d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt.

sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform können die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

30

Sollen neben den Nukleinsäuresequenzen weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

35

Hierbei kann das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n), der Expressionskassette oder des Vektors in die entsprechenden Organismen (Transformation) prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

40

Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) "Current protocols in molecular biology", John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. "Guide to Yeast Genetics and

Molecular Biology", Methods in Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen. Bei der Transformation von filamentösen Pilzen bieten sich zum einen die Herstellung von Protoplasten und Transformation mit Hilfe von PEG (Wiebe et al. (1997) Mycol. Res. 101 (7): 971-877; Proctor et al. (1997) Microbiol. 143, 2538-2591), zum anderen die

5 Transformation unter zur Hilfe nahme von *Agrobacterium tumefaciens* (de Groot et al. (1998) Nat. Biotech. 16, 839-842) an.

Für dikotyle Pflanzen können die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten

10 oder stabilen Transformation genutzt werden. Geeignete Methoden sind das biolistische Verfahrens oder durch Protoplastentransformation (vergl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge), die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in

15 DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec.Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben.

20 Die Transformation mittels *Agrobakterien* sowie die für die Transformation zu verwendenden Vektoren sind dem Fachmann bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind,

25 durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der *Agrobakterien* integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in *Agrobakterien* replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in *Agrobakterien* replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die *Agrobakterien* transformiert werden (; Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187) , EP A 0 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al.,

30 Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287).

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren wurde beschrieben ( Chan et al, Plant Mol. Biol. 22(1993), 491-506; Hiei et al, Plant J. 6 (1994) 271-282; Deng et al; Science in China 33 (1990), 28-34; Wilmink et al,

40 Plant Cell Reports 11,(1992) 76-80; May et al; Biotechnology 13 (1995) 486-492; Conner und Domisse; Int. J. Plant Sci. 153 (1992) 550-555; Ritchie et al; Transgenic Res.

(1993) 252-265). Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux; Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil et al; Biotechnology 11 (1992), 667-674; Ritala et al, Plant Mol. Biol. 24, (1994) 317-325; Spencer et al, Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625-631) die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen; die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z.B. WO 95/06128; EP 0513849 A1; EP 0465875 A1; EP 0292435 A1; Fromm et al, Biotechnology 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al, Plant Cell 2 (1990), 603-618; Koziel et al, Biotechnology 11(1993) 194-200; Moroc et al, Theor Applied Genetics 80 (190) 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al, s.o.; Weizen (Nehra et al, Plant J. 5(1994) 285-297).

Mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie Arabidopsis oder Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Die durch Transformation mit einer der oben beschriebenen Ausführungsformen einer Expressionskassette, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem Vektor, enthaltend die vorstehend genannte Expressionskassette, hergestellten transgenen Organismen sowie die mittels Expression aus dem transgenen Organismus erhältliche rekombinante Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von transgenen Organismen enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionskassette z.B. für die Bereitstellung rekombinanten Proteins und/oder die Verwendung dieser Organismen in in vivo Testsystemen.

Bevorzugte Organismen für die rekombinante Expression sind neben Bakterien, Hefen, Moose, Algen, Pilze auch eukaryontische Zelllinien.

- 5 Bevorzugte Moose sind *Physcomitrella patens* oder weitere in Kryptogamen, Bd.2, Moose, Farne, 1991, Springer Verlag (ISBN 3540536515), beschriebene Moose.

- 10 Innerhalb der Bakterien sind Bakterien der Gattung *Escherichia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung *Synechocystis*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Scytonema*, *Oscillatoria*, *Plectonema* und *Nostoc*, besonders bevorzugt *Synechocystis* oder *Anabaena* bevorzugt.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*.

- 15 Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria*, *Mortierella*, *Saprolegnia*, *Pythium*, oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) beschriebene Pilze.

- 20 Bevorzugte Pflanzen sind insbesondere ausgewählt unter monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis oder Hafer sowie dem Zuckerrohr. Ferner sind die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen insbesondere ausgewählt unter dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Brassicaceae wie Raps, Kresse, *Arabidopsis*, Kohlarten oder Canola; Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika; Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula; Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini, oder Lein, Baumwolle, Hanf, Flachs, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Zuckerrübe oder verschiedene Baum-, Nuss- und Weinspecies.

- 30 Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere geeignet wie beispielsweise *C. elegans*.

Bevorzugt ist auch die Verwendung von Expressionssystemen und Vektoren, die öffentlich zugänglich oder kommerziell erhältlich sind.

- 35 Zur Verwendung in *E. coli* Bakterien sind die typischen vorteilhaften, kommerziell erhältlichen Fusions- und Expressionsvektoren pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40], pMAL (New England Biolabs; Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase beinhaltet (GST), Maltose Bindeprotein, oder Protein A, die pTrc-Vektoren (Amann et al., 40 (1988) *Gene* 69:301-315) der "pKK233-2" von CLONTECH, Palo Alto, CA und die



"pET"-, und die "pBAD"-Vektor-Serien von Stratagene, La Jolla zu nennen.

Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943),  
5 pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54:113-123), and pYES-Derivate, pGAPZ-Derivate, pPICZ-Derivate sowie die Vektoren des "Pichia Expression Kit" (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*,  
10 J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzellexpressionsvektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf9, Sf21 oder Hi5 Zellen, welche über rekombinante Baculoviren infiziert werden. Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39). Weiterhin genannt seien die Baculovirus Expressionssysteme "MaxBac 2.0 Kit" und "Insect Select System" von Invitrogen, Calsbad oder "BacPAK Baculovirus Expressionssystem" von CLONTECH, Palo Alto, CA. Insektenzellen eignen sich in besonderer Weise zur Überexpression eukaryontischer Proteine, da sie posttranslationale  
15 Modifikationen der Proteine durchführen, die in Bakterien und Hefen nicht möglich sind. Die Handhabung von Insektenzellen in Zellkultur sowie ihre Infektion zur Expression von Proteinen sind dem Fachmann bekannt und können in Analogie zu bekannten Methoden erfolgen (Luckow und Summers, *Bio/Tech.* 6, 1988, pp.47-55; Glover and Hames (eds) in *DNA Cloning 2, A practical Approach, Expression Systems*, Second  
20 Edition, Oxford University Press, 1995, 205-244).

Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzenexpressionsvektoren finden sich wie obenstehend erwähnt in Becker, D., et al. (1992) "New plant binary vectors with selectable  
30 markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiel für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC genannt in: Seed, B. (1987) *Nature* 329:840 oder Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6:187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40. Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.  
40 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.

5 Die transgenen Organismen, welche eine Nukleisäuresequenz umfassend enthalten, werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung beansprucht.

Sämtliche, oben beschriebenen Ausführungsformen der transgenen Organismen werden unter dem Begriff "erfindungsgemäßer transgener Organismus" zusammengefaßt.

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH in einem Verfahren zur Identifizierung von Testverbindungen mit herbizider Wirkung.

15 Bevorzugt umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung die folgenden Schritte:

- i. Inkontaktbringen von Malat Dehydrogenase, bevorzugt von MDH mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen, die die Bindung der Testverbindung(en) an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH erlauben; und
- 20 ii. Nachweis, ob die Testverbindung an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt an die MDH aus i) bindet; oder
- iii. Nachweis, ob die Testverbindung die enzymatische oder biologische Aktivität der Malat Dehydrogenase, bevorzugt der MDH aus i) reduziert oder blockiert; oder
- 25 iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression einer Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH reduziert oder blockiert.

30 Der Nachweis gemäß Schritt (ii) des oben stehenden Verfahrens kann anhand von Techniken, welche die Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand aufzeigen, erfolgen. Hierbei kann entweder die Testverbindung oder das Enzym eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope, chemilumineszierende oder enzymatische Markierung. Beispiele für enzymatische Markierungen sind

35 Meerrettich Peroxidase, alkalische Phosphatase oder Luziferase. Die anschließende Detektion richtet sich nach der Markierung und ist dem Fachmann bekannt.

Hierbei sind insbesondere fünf bevorzugte Ausführungsformen zu nennen, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch für Hochdurchsatzmethoden

40 (High Troughput Screening, HTS) geeignet sind:

1. Über Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 11753-11575) läßt sich die durchschnittliche Diffusionsrate eines Fluoreszenzmoleküls in Abhängigkeit zur Masse in einem kleinen Probenvolumen bestimmen. Durch Messen der Massenänderung bzw. der daraus resultierenden veränderten Diffusionsrate einer Testverbindung beim Binden an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt die MDH läßt sich FCS zur Bestimmung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen einsetzen. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren so konzipiert sein, dass eine durch ein Fluoreszenzmolekül markierte chemische Referenzverbindung durch weitere Testverbindungen verdrängt wird ("Verdrängungsassay").
2. Die Fluoreszenzpolarisation nutzt die Eigenschaft eines mit polarisiertem Licht angeregten ruhenden Fluorophors ebenfalls wieder polarisiertes Licht zu emittieren. Kann der Fluorophor allerdings während des angeregten Zustands rotieren, so geht die Polarisation des emittierten Fluoreszenzlichts mehr oder weniger verloren. Bei sonst gleichen Bedingungen (z.B. Temperatur, Viskosität, Lösungsmittel) ist die Rotation eine Funktion der Molekülgröße, womit man über das Messsignal eine Aussage über die Größe des am Fluorophor gebundenen Rests treffen kann (Methods in Enzymology 246 (1995), pp. 283-300). Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt die MDH aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein.
3. Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer" (FRET) basiert auf der strahlungslosen Energieübertragung zwischen zwei räumlich benachbarten Fluoreszenzmolekülen unter geeigneten Bedingungen. Eine Voraussetzung ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donormoleküls mit dem Anregungsspektrum des Akzeptormoleküls. Durch Fluoreszenzmarkierung der Malat Dehydrogenase, bevorzugt der MDH und den auf Bindung Tetsverbindung kann mittels FRET die Bindung gemessen werden (Cytometry 34, 1998, pp. 159-179). Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Eine besonders geeignete Ausführungsform der FRET Technologie ist die "Homogenous Time Resolved Fluorescence" (HTRF), wie sie von Packard BioScience vertrieben wird.
4. Surface Enhanced-Laser Desorption/Ionisation (SELDI) in Kombination mit einem "Time of Flight" Massenspektrometer (MALDI-TOF) ermöglicht die schnelle Analyse von Molekülen auf einem Träger und kann zur Analyse von Protein-

- Ligand Wechselwirkungen verwendet werden (Worral et al., (1998) Anal. Biochem. 70:750-756). In einer bevorzugten Ausführungsform immobilisiert man nun die Malat Dehydrogenase, bevorzugt die MDH auf einem geeigneten Träger und inkubiert diesen mit der Testverbindung. Nach einem oder mehreren geeigneten
- 5 Waschschritten kann man die an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt die MDH zusätzlich gebundenen Moleküle der Testverbindung mittels der oben erwähnten Methodik detektieren und somit an die Malat Dehydrogenase, bevorzugt an die MDH gebundene Testverbindungen selektieren.
- 10 5. Die Messung von Oberflächen Plasmonenresonanz basiert auf der Änderung des Brechnungsindex an einer Oberfläche beim Binden einer Testverbindung an ein auf besagter Oberfläche immobilisierten Protein. Da die Änderung des Brechnungsindex für eine definierte Änderung der Massenkonzentration an der Oberfläche quasi für alle Proteine und Polypeptide identisch ist, kann diese Methode
- 15 prinzipiell auf jedes Protein angewendet werden (Lindberg et al. Sensor Actuators 4 (1983) 299-304; Malmquist Nature 361 (1993) 186-187). Die Messung kann beispielsweise mit Hilfe der von Biacore (Freiburg) vertriebenen auf Oberflächen-Plasmonenresonanz basierenden Analyseautomaten in einem Durchsatz von derzeit bis zu 384 Proben pro Tag durchgeführt werden. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer Testverbindung an
- 20 die Malat Dehydrogenase, bevorzugt an die MDH aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein.
- 25 Die über die oben genannten Verfahren 1 bis 5 identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein. Sämtliche, über die oben genannten Verfahren identifizierten Substanzen können anschließend in einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens auf ihre herbizide Wirkung überprüft werden.
- 30 Auch besteht die Möglichkeit, über Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Malat Dehydrogenase, bevorzugt der MDH mittels Röntgenstrukturanalyse weitere potentielle herbizide Wirkstoffe mittels "Molecular Modelling" zu detektieren. Die Herstellung von für die Röntgenstrukturanalyse benötigten Proteinkristallen sowie die entsprechenden Messungen und anschließenden Auswertungen dieser Messungen,
- 35 die Detektion einer Bindungsstelle im Protein sowie die Vorhersage möglicher Inhibitorstrukturen sind dem Fachmann bekannt. Über "Molecular Modelling" ist prinzipiell auch eine Optimierung der über die oben genannten Verfahren identifizierten Verbindungen möglich.
- 40 Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und ii) basiert, besteht darin, daß eine Testverbindung selektiert wird, wel-

che die enzymatische Aktivität einer Malat Dehydrogenase, vorzugsweise MDH reduziert oder blockiert.

5 Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und ii) basiert, besteht darin, daß eine Testverbindung selektiert wird, welche die enzymatische Aktivität einer Malat Dehydrogenase, vorzugsweise MDH reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, vorzugsweise MDH mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, vorzugsweise MDH verglichen wird.

10 Eine bevorzugte Ausführungsform des auf den Schritten i) und ii) basierenden Verfahrens besteht darin, dass

15 i. eine Malat Dehydrogenase, bevorzugt eine MDH in einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß eine Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH enthält, kultiviert wird;

20 ii. die Malat Dehydrogenase, bevorzugt die MDH aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und

25 iii. eine Verbindung selektiert wird, welche die Aktivität der Malat Dehydrogenase, bevorzugt der MDH reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase.

Eine bevorzugte Ausführungsform des auf den Schritten i) und ii) basierenden Verfahrens besteht darin, dass

30 i. eine Malat Dehydrogenase, bevorzugt eine MDH in einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß eine Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH enthält, kultiviert wird;

35 ii. die Malat Dehydrogenase, bevorzugt die MDH aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und

40 iii. eine Verbindung selektiert wird, welche die Aktivität der Malat Dehydrogenase, bevorzugt der MDH reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH mit der Aktivität

einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH ermittelt wird.

- Die Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH enthaltende Lösung kann aus dem Lysat des ursprünglichen Organismus oder des transgenen, mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierten Organismus bestehen. Falls erforderlich kann die Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH partiell oder vollständig über gängige Methoden aufgereinigen werden. Eine allgemeine Übersicht über gängige Techniken zur Reinigung von Proteinen sind beispielsweise in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994); ISBN 0-87969-309-6 beschrieben. Bei rekombinanter Darstellung kann eine Reinigung des mit einem Affinitäts-Tag fusionierten Proteins über nach dem Fachmann bekannten Affinitätschromatographie erfolgen.
- Die für in vitro Verfahren benötigte Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH kann somit entweder mittels heterologer Expression aus einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus oder aus einem Organismus, der ein Enzym mit der enzymatischen Aktivität vorzugsweise biologischen einer Malatdehydrogenase enthält, isoliert werden, zum Beispiel aus einer unerwünschten Pflanze, wobei unter dem Begriff der unerwünschten Pflanze die eingangs erwähnten Spezies zu verstehen sind.
- Zur Identifizierung von herbiziden Verbindungen wird nun die Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH mit einer Testverbindung inkubiert. Nach einer Reaktionszeit wird die enzymatische Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH mit der enzymatischen Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH ermittelt. Bei Inhibition der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH beobachtet man eine signifikante Abnahme der Aktivität im Vergleich zur Aktivität des nicht inhibierten erfindungsgemäßen Polypeptides, wobei eine Abnahme von mindestens 10%, vorteilhaft mindestens 20%, bevorzugt mindestens 30%, besonders bevorzugt um mindestens 50% bis hin zu einer 100% Reduktion (Blockierung) erzielt wird. Bevorzugt mindestens 50% Hemmung bei Konzentrationen der Testverbindung von  $10^{-4}$  M, bevorzugt bei  $10^{-5}$  M, besonders bevorzugt von  $10^{-6}$  M bezogen auf Enzymkonzentration im mikromolaren Bereich.
- Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH kann beispielsweise über einen Aktivitätstest erfolgen, in welchem die Zunahme des Produktes, die Abnahme des Substrates (oder Eduktes) bzw. die Ab- oder Zunahme des Cofaktors oder über eine Kombination aus mindestens zwei der vorstehend genannten Parameter in Abhängigkeit einer definierten Zeitspanne bestimmt werden.

Beispiele für geeignete Substrate sind z.B. Malat (-)-Tartrate(S,S), (S)-Malate, 2-Hydroxybutyrat, 2-Hydroxyglutarate 2-Hydroxymalonat, 2-Oxobutyrat, 2-oxoglutarat, Ketomalonat, L-Malat, meso-Tartrat(S,R), oxalacetat und für geeignete Cofaktoren NAD<sup>+</sup>, NADH, APAD, APADH. Je nach verwendeter Malat Dehydrogenase kann auch

5 NADPH als Cosubstrat eingesetzt werden. Gegebenenfalls können auch Derivate der vorstehend genannten Verbindungen verwendet werden, die eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope oder chemilumineszierende Markierung.

10 Die für den Aktivitätstest einzusetzenden Mengen an Substrat können zwischen 0.5-100 mM und Mengen an Cofaktor zwischen 0.1-5 mM bezogen auf 1-100 µg/ml Enzym liegen.

Die Bestimmung der Aktivität kann beispielsweise in Analogie zu dem von Gietl et al

15 (1996, BBA 1274, 48-58) beschriebenen Verfahren erfolgen.

Des weiteren kann die Bestimmung der Aktivität in Schritt iii) des oben genannten Verfahrens

- 20 a) photometrisch über die Umwandlung von NADH zu NAD<sup>+</sup>; und/oder
- b) photometrisch über die Umwandlung von NAD<sup>+</sup> zu NADH erfolgt; oder
- c) photometrisch über die Umwandlung von APAD zu APADH; oder
- 25 erfolgen.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und iii) basiert, besteht aus den folgenden Schritten:

- 30 i. Herstellung eines transgenen Organismus enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine glyoxsomale Malat Dehydrogenase umfassend
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- 35 b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestell-
- 40

ten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

- 5 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66%, vorzugsweise 81% aufweist, ableiten läßt;
- 10 ii. Aufbringen einer Testverbindung auf den transgenen Organismus nach i) und auf einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps;
- 15 iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testverbindung; und
- iv. Selektion von Testverbindungen, die ein vermindertes Wachstum oder eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken.

Im oben genannten Verfahren wird in dem transgenen Organismus Malat Dehydrogenase überexprimiert.

20

Hierbei beträgt der Wachstumsunterschied der in Schritt iv) zur Selektion eines Inhibitors mit herbizider Wirkung mindestens 10%, vorzugsweise 20%, bevorzugt 30%, besonders bevorzugt 40% und ganz besonders bevorzugt 50%.

- 25 Der transgene Organismus ist hierbei vorzugsweise eine Pflanze, Alge, ein Cyanobakterium z.B. der Gattung Synechocystis oder ein Proteobakterium wie etwa Magnetococcus sp. MC1, bevorzugt Pflanzen, die sich mittels gängiger Techniken transformieren lassen, wie Arabidopsis thaliana, Solanum tuberosum, Nicotiana Tabacum, Cyanobakterien die sich leicht transformieren lassen, wie z.B. Synechocystis, in welchen die
- 30 für ein erfindungsgemäße Polypeptid kodierende Sequenz über Transformation inkorporiert wurde. Diese transgenen Organismen weisen daher eine erhöhte Toleranz gegen Verbindungen auf, welche das erfindungsgemäße Polypeptid inhibieren. Hierbei können auch "knock-out"-Mutanten verwendet werden, bei denen das in diesem Organismus natürlich vorhandene analoge Gen für Malat Dehydrogenase, bevorzugt
- 35 MDH gezielt ausgeschaltet worden ist.

Die vorstehend genannte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann jedoch auch zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wirkung verwendet werden. Hierbei wird als transgener Organismus eine Pflanze eingesetzt.

- 40 Das Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wir-



kung umfasst somit die folgenden Schritte:

- 5 i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine glyoxsomale Malat Dehydrogenase umfassend
    - a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
    - 10 b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
    - c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
    - 15 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66%, vorzugsweise 81% aufweist, ableiten läßt;
    - 20
  - ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;
  - 25 iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und
  - 30 iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transgenen Pflanze.
- Im oben genannten Verfahren wird in dem transgenen Organismus Malat Dehydrogenase überexprimiert.
- Hierbei werden in Schritt iv) Testverbindungen selektiert, die ein verändertes Wachstum des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken. Unter verändertem Wachstum ist hierbei eine Hemmung des vegetativen Wachstums der Pflanzen zu verstehen, was sich insbesondere in einer Reduzierung des Längenwachstums äußern kann. Die behandelten Pflanzen weisen demgemäß einen gedrungenen Wuchs auf; außerdem ist eine dunklere Blattfärbung zu beobachten. Weiterhin ist unter verändertem Wachstum auch eine zeitliche Veränderung des Reifeverlaufs, eine Hemmung oder Vermehrungen seitli-

cher Verzweigungen der Pflanzen, eine Verkürzung bzw. Verlängerung der Entwicklungsstadien, eine Erhöhung der Standfestigkeit, das Wachstum größerer Mengen an Knospen, Blüten, Blättern, Früchten, Samenkörnern, Wurzeln und Knollen, eine Erhöhung des Zuckergehaltes in Pflanzen wie Zuckerrüben, Zuckerrohr sowie Zitrusfrüchten, des Proteingehaltes in Pflanzen wie Getreide oder Soja oder eine Stimulierung des Latexfluß an Gummibäumen zu verstehen. Die Detektion dieses veränderten Wachstums ist dem Fachmann bekannt.

10 Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch mehrere Testverbindungen in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Wenn durch eine Gruppe von Testverbindungen eine Beeinflussung des Targets erfolgt, dann ist es entweder möglich, die einzelnen Testverbindungen direkt zu isolieren oder die Gruppe von Testverbindungen in verschiedene Untergruppen zu teilen, z.B. wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Zahl der verschiedenen Testverbindungen im erfindungsgemäßen Verfahren zu reduzieren. Das erfindungsgemäße  
15 Verfahren wiederholt man dann mit der einzelnen Testverbindung oder der entsprechenden Untergruppe von Testverbindungen. Abhängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Untergruppe nur noch  
20 eine geringe Anzahl von Testverbindungen oder nur noch eine Testverbindung umfaßt.

Alle oben beschriebenen Verfahren für die Identifizierung von Inhibitoren mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung werden im folgenden als "erfindungsgemäße Verfahren" bezeichnet.

25 Sämtliche, über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen können anschließend auf ihre herbizide oder wachstumsregulatorische Wirkung in vivo überprüft werden. Eine Möglichkeit zur Prüfung der Verbindungen auf herbizide Wirkung ist die Verwendung der Wasserlinse *Lemna minor* in Mikrotiterplatten. Als Parameter können Veränderungen des Chlorophyllgehalts und die Photosyntheseleistung  
30 gemessen werden. Es ist auch möglich, die Verbindung auf unerwünschte Pflanzen direkt zu applizieren, wobei die herbizide Wirkung z.B. über eingeschränktes Wachstum festgestellt werden kann.

35 Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch vorteilhaft in Hochdurchsatzverfahren, sog. HTS durchgeführt werden, welches das parallele Testen einer Vielzahl verschiedener Verbindungen ermöglicht.

40 Im HTS bietet sich für die praktische Durchführung die Verwendung von Trägern an, die eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, einen oder mehrere die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthaltenden Vektoren, einen

oder mehrere transgene Organismen, welche mindestens eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten oder eines oder mehrere (Poly)peptide codiert über die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten. Der verwendete Träger kann fest oder flüssig sein, ist bevorzugt fest, besonders bevorzugt eine Mikrotiterplatte. Die vorstehend genannten Träger sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Gemäß der am weit verbreitesten Technik werden 96-well, 384-well und 1536 well Mikrotiterplatten verwendet, die in der Regel Volumina von 200 µl umfassen können. Neben den Mikrotiterplatten sind die weiteren Bestandteile eines HTS-Systems passend zu den entsprechenden Mikrotiterplatten wie viele Instrumente, Materialien, automatische Pipettiervorrichtungen, Robotoren, automatisierte Plattenleser sowie Plattenwascher kommerziell erhältlich.

Neben den auf Mikrotiterplatten basierenden HTS-Verfahren können auch sogenannte "free format assays" oder Testsysteme, die zwischen den Proben keine physischen Barrieren aufweisen, verwendet werden wie z.B. in Jayaickreme et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 19 (1994) 161418; Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial Libraries, First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 710, 1995); Salmon et al., Molecular Diversity 2 (1996), 5763 und US 5,976,813.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert nach den erfindungsgemäßen Verfahren. Diese Verbindungen werden im folgenden "selektierte Verbindungen" genannt. Sie weisen ein Molekulargewicht von kleiner als 1000 g/mol, vorteilhaft kleiner 500 g/mol, bevorzugt kleiner 400 g/mol, besonders bevorzugt kleiner 300 g/mol. Verbindungen mit herbizider Wirkung weisen einem Ki-Wert kleiner 1 mM, bevorzugt kleiner 1 µM, besonders bevorzugt kleiner 0,1 µM ganz besonders bevorzugt kleiner 0,01 µM aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung identifiziert nach den erfindungsgemäßen Verfahren. Auch diese Verbindungen werden im folgenden "selektierte Verbindungen" genannt.

Die selektierte Verbindungen können natürlich auch in Form ihrer landwirtschaftlich brauchbaren Salze vorliegen. Unter landwirtschaftlich brauchbaren Salzen kommen vor allem die Salze derjenigen Kationen oder die Säureadditionssalze derjenigen Säuren in Betracht, deren Kationen beziehungsweise Anionen die herbizide Wirkung der über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen mit herbizider Wirkung nicht negativ beeinträchtigen.

Ferner können die selektierte Verbindungen sofern sie asymmetrisch substituierte  $\alpha$ -Kohlenstoffatome enthalten, entweder als Racemate, Enantiomerengemische, reine

Enantiomere oder, sofern sie chirale Substituenten aufweisen, auch als Diastereomeregemische vorliegen.

Die selektierten Verbindungen können chemisch synthetisierte oder mikrobiologisch produzierte Stoffe sein und z.B. in Zellextrakten von z.B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden z.B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology the cell, 3rd Edition (1994), z.B. Kapitel 17. Die selektierte Verbindungen können auch aus umfangreichen Substanzbibliotheken stammen.

Mögliche Testverbindungen können Expressionsbibliotheken wie z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder ähnliches sein (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879–880; Hupp, Cell. 83 (1995), 237–245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193–198 und darin zitierte Referenzen).

Die selektierte Verbindungen können zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder als Wachstumsregulatoren verwendet werden. Herbizide Zusammensetzungen, welche die selektierten Verbindungen enthalten, bekämpfen Pflanzenwuchs auf Nichtkulturflächen sehr gut. In Kulturen wie Weizen, Reis, Mais, Soja und Baumwolle wirken sie gegen Unkräuter und Schadgräser, ohne die Kulturpflanzen nennenswert zu schädigen. Dieser Effekt tritt vor allem bei niedrigen Aufwandmengen auf. Die selektierten Verbindungen können zur Bekämpfung der oben bereits erwähnten Schadpflanzen verwendet werden.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Applikationsmethode können selektierten Verbindungen bzw. diese enthaltende herbizide Zusammensetzungen vorteilhaft noch in einer weiteren Zahl von Kulturpflanzen zur Beseitigung unerwünschter Pflanzen eingesetzt werden. In Betracht kommen beispielsweise folgende Kulturen:

Allium cepa, Ananas comosus, Arachis hypogaea, Asparagus officinalis, Beta vulgaris spec. altissima, Beta vulgaris spec. rapa, Brassica napus var. napus, Brassica napus var. napobrassica, Brassica rapa var. silvestris, Camellia sinensis, Carthamus tinctorius, Carya illinoensis, Citrus limon, Citrus sinensis, Coffea arabica (Coffea canephora, Coffea liberica), Cucumis sativus, Cynodon dactylon, Daucus carota, Elaeis guineensis, Fragaria vesca, Glycine max, Gossypium hirsutum, (Gossypium arboreum, Gossypium herbaceum, Gossypium vitifolium), Helianthus annuus, Hevea brasiliensis, Hordeum vulgare, Humulus lupulus, Ipomoea batatas, Juglans regia, Lens culinaris, Linum usitatissimum, Lycopersicon lycopersicum, Malus spec., Manihot esculenta, Medicago sativa, Musa spec., Nicotiana tabacum (N.rustica), Olea europaea, Oryza sativa, Pha-

seolus lunatus, Phaseolus vulgaris, Picea abies, Pinus spec., Pisum sativum, Prunus  
avium, Prunus persica, Pyrus communis, Ribes sylestre, Ricinus communis, Saccha-  
rum officinarum, Secale cereale, Solanum tuberosum, Sorghum bicolor (s. vulgare),  
Theobroma cacao, Trifolium pratense, Triticum aestivum, Triticum durum, Vicia faba,  
5 Vitis vinifera, Zea mays.

Darüber hinaus können die selektierten Verbindungen auch in Kulturen, die durch  
Züchtung einschließlich gentechnischer Methoden gegen die Wirkung von Herbiziden  
tolerant sind, verwandt werden. Die Herstellung dieser Kulturen wird weiter unten  
10 beschrieben.

Weiter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der oben bereits  
erwähnten herbiziden oder wachstumsregulatorischen Zusammensetzung, dadurch  
gekennzeichnet dass man selektierten Verbindungen mit geeigneten Hilfsmitteln zu  
15 Pflanzenschutzmitteln formuliert.

Die selektierten Verbindungen können z.B. in Form von direkt versprühbaren wässri-  
gen Lösungen, Pulvern, Suspensionen, auch hochprozentigen wäßrigen, öligen oder  
sonstigen Suspensionen bzw. Suspoemulsionen oder Dispersionen, emulgierbaren  
20 Konzentraten, Emulsionen, Öldispersionen, Pasten, Stäubemitteln, Streumitteln oder  
Granulaten formuliert werden und durch Versprühen, Vernebeln, Verstäuben,  
Verstreuen oder Gießen angewendet werden. Die Anwendungsformen richten sich  
nach den Verwendungszwecken und der Natur der selektierten Verbindungen und  
sollte in jedem Fall möglichst die feinste Verteilung der selektierten Verbindungen  
25 gewährleisten. Die herbiziden Zusammensetzung enthalten eine herbizid wirksame  
Menge mindestens einer selektierten Verbindung und für die Formulierung von herbizi-  
den Zusammensetzungen übliche Hilfsstoffe.

Zur Herstellung von Emulsionen, Pasten oder wässrigen oder ölhaltigen Formulie-  
30 rungen sowie dispergierbaren Konzentraten (DC) können die selektierten Verbindungen in  
einem Öl oder Lösungsmittel gelöst oder dispergiert werden, wobei weitere Formulie-  
rungshilfsstoffe zur Homogenisierung zugesetzt werden können. Es können aber auch  
aus selektierter Verbindung, gegebenenfalls Lösungsmitteln oder Öl sowie optional  
weiteren Hilfsmitteln bestehende flüssige oder feste Konzentrate hergestellt werden,  
35 die zur Verdünnung mit Wasser geeignet sind. Hier zu nennen sind emulgierbare  
Konzentrate (EC, EW), Suspensionen (SC), lösliche Konzentrate (SL), dispergierbaren  
Konzentrate (DC), Pasten, Pastillen netzbaren Pulvern oder Granulaten, wobei die  
festen Formulierungen entweder in Wasser löslich (soluble) oder dispergierbar (wet-  
table) sein können. Desweiteren können entsprechende Pulver bzw. Granulate oder  
40 Tabletten noch mit einem festen, den Abrieb oder eine vorzeitige Wirkstofffreisetzung

verhinderenden Überzug ("coating") versehen werden.

- Prinzipiell sind unter dem Begriff "Hilfsmittel" folgende Verbindungsklassen zu verstehen: Antischäumungsmittel, Verdicker, Netzmittel, Haftmittel, Dispergiermittel, Emulgiertmittel, Bakterizide und/oder thixotrophe Agentien. Die Bedeutung der oben genannten Mittel ist dem Fachmann bekannt.

- SLs, EWs und ECs können durch einfaches Mischen der entsprechenden Inhaltsstoffe hergestellt werden, Pulver über Mischen oder Vermahlen in speziellen Mühlentypen (z.Bsp. Hammermühlen). DC, SCs und SEs werden üblicherweise über Naßvermahlung ("wet milling") hergestellt, wobei ein SE aus einem SC durch Zugabe einer organischen Phase, die weitere Hilfsmittel oder selektierte Verbindungen enthalten kann, hergestellt werden kann. Die Herstellung ist bekannt. Pulver-, Streu- und Stäubemittel können vorteilhaft durch Mischen oder gemeinsames Vermahlen der wirksamen Substanzen mit einem festen Trägerstoff hergestellt werden. Granulate, z.B. Umhüllungs-, Imprägnierungs- und Homogengranulate können durch Bindung der selektierten Verbindungen an feste Trägerstoffe hergestellt werden. Weitere Details der Herstellung sind dem Fachmann bekannt, und z.Bsp. in folgenden Schriften aufgeführt: US 3,060,084, EP-A 707445 (für flüssige Konzentrate), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, Dec. 4, 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4th Ed., McGraw-Hill, New York, 1963, pages 8-57 und ff. WO 91/13546, US 4,172,714, US 4,144,050, US 3,920,442, US 5,180,587, US 5,232,701, US 5,208,030, GB 2,095,558, US 3,299,566, Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, Hance et al., Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 und Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Federal Republic of Germany), 2001.

- Inerte flüssige und/oder feste Trägerstoffe geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. flüssige Zusatzstoffe wie Mineralölfraktionen von mittlerem bis hohem Siedepunkt, wie Kerosin oder Dieselöl, ferner Kohlenteeröle sowie Öle pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, aliphatische, cyclische und aromatische Kohlenwasserstoffe, z.B. Paraffin, Tetrahydronaphthalin, alkylierte Naphthaline oder deren Derivate, alkylierte Benzole oder deren Derivate, Alkohole wie Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Cyclohexanol, Ketone wie Cyclohexanon oder stark polare Lösungsmittel, z.B. Amine wie N-Methylpyrrolidon oder Wasser.

- Feste Trägerstoffe sind beispielsweise Mineralerden wie Kieselsäuren, Kieselgele, Silikate, Talkum, Kaolin, Kalkstein, Kalk, Kreide, Bolus, Löß, Ton, Dolomit, Diatomenerde, Calcium- und Magnesiumsulfat, Magnesiumoxid, gemahlene Kunststoffe, Düngemittel, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumnitrat, Harnstoffe und

pflanzliche Produkte wie Getreidemehl, Baumrinden-, Holz- und Nußschalenmehl, Cellulosepulver oder andere feste Trägerstoffe.

5 Oberflächenaktive Stoffe (Tenside) geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. Alkali-, Erdalkali-, Ammoniumsalze von aromatischen Sulfonsäuren, z.B. Lignin-, Phenol-, Naphthalin- und Dibutylnaphthalinsulfonsäure, sowie von Fettsäuren, Alkyl- und Alkylarylsulfonaten, Alkyl-, Laurylether- und Fettalkoholsulfaten, sowie Salze sulfatierter Hexa-, Hepta- und Octadecanolen sowie von Fettalkoholglykolether, Kondensationsprodukte von sulfoniertem Naphthalin und seiner Derivate mit Formaldehyd, Kondensationsprodukte des Naphthalins bzw. der Naphthalinsulfonsäuren mit Phenol und Formaldehyd, Polyoxyethylenoctylphenoether, ethoxyliertes Isooctyl-, Octyl- oder Nonylphenol, Alkylphenyl-, Tributylphenylpolyglykolether, Alkylarylpolyetheralkohole, Isotridecylalkohol, Fettalkoholethylenoxid-Kondensate, ethoxyliertes Rizinusöl, Polyoxyethylenalkylether oder 10 Polyoxypropylenalkylether, Laurylalkoholpolyglykoletheracetat, Sorbitester, Lignin-Sulfitablaugen oder Methylcellulose.

Die Applikation der herbiziden Zusammensetzungen bzw. der selektierten Verbindungen kann im Vorauf- oder im Nachaufverfahren erfolgen. Sind die selektierten 20 Verbindungen für gewisse Kulturpflanzen weniger verträglich, so können Ausbringungstechniken angewandt werden, bei welchen die selektierten Verbindungen mit Hilfe der Spritzgeräte so gespritzt werden, daß die Blätter der empfindlichen Kulturpflanzen nach Möglichkeit nicht getroffen werden, während die selektierten Verbindungen auf die Blätter darunter wachsender unerwünschter Pflanzen oder die unbedeckte 25 Bodenfläche gelangen (post-directed, lay-by).

Die Aufwandmengen an selektierten Verbindungen betragen je nach Bekämpfungsziel, Jahreszeit, Zielpflanzen und Wachstumsstadium 0.001 bis 3.0, vorzugsweise 0.01 bis 1.0 kg/ha.

30 Die Bereitstellung des herbiziden Targets ermöglicht weiterhin ein Verfahren zur Identifizierung einer Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH, welche nicht oder nur eingeschränkt durch ein Herbizid, welches als Wirkort die Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH hat, z.B. die herbizid wirkenden selektierten Verbindungen, gehemmt wird. Im 35 folgenden wird ein sich derart von der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH unterscheidendes Protein als MDH -Variante bezeichnet, welches durch eine Nukleinsäuresequenz codiert wird, welche

40 i) für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Malat Dehydrogenase kodiert, welche durch nach den oben genannten Verfahren ermittelte Substanzen

mit herbizider Wirkung, welche Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH inhibieren, nicht inhibiert wird;

- 5      ii) durch ein funktionelles Äquivalent der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 63% zu der SEQ ID NO:3 kodiert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform besteht das oben genannte Verfahren zur Erzeugung von Nukleinsäuresequenzen codierend für MDH -Varianten von Nukleinsäuresequenzen umfassen aus folgenden Schritten:

- 10      a) Expression der von den oben genannten Nukleinsäuren kodierten Proteine in einem heterologen System oder in einem zellfreien System;
- 15      b) Randomisierte oder gerichtete Mutagenese des Proteins durch Modifikation der Nukleinsäure;
- 20      c) Messung der Interaktion des veränderten Genprodukts mit dem Herbizid;
- 20      d) Identifizierung von Derivaten des Proteins die eine geringere Interaktion aufweisen;
- 25      e) Testung der biologischen Aktivität des Proteins nach Applikation des Herbizides;
- 25      f) Auswahl der Nukleinsäuresequenzen, die eine veränderte biologische Aktivität gegenüber dem Herbizid aufweisen.

30      Das funktionelle Äquivalent der SEQ ID NO:3 gemäß ii) weist eine Homologie mit der SEQ ID No:3 von mindestens 63%, 64%, 65%, 66% vorzugsweise mindestens 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74% vorzugsweise mindestens 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80% bevorzugt mindestens 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

35      Die nach dem oben beschriebenen Verfahren nach ausgewählten Sequenzen werden vorteilhaft in einen Organismus eingebracht. Deshalb ist ein weiterer Erfindungsgegenstand ein nach diesem Verfahren hergestellter Organismus. Bevorzugt ist der Organismus eine Pflanze, besonders bevorzugt eine der oben definierten Kulturpflanzen.



Anschließend erfolgt die Regeneration ganzer Pflanzen und Überprüfung der Resistenz gegenüber der selektierten Verbindung in intakten Pflanzen.

5      Veränderte Proteine und/oder Nukleinsäuren, die in Pflanzen Resistenz gegen die selektierten Verbindungen vermitteln können, können aus den oben genannten Nukleinsäuresequenzen auch über die sogenannte "site directed mutagenesis" hergestellt werden, durch diese Mutagenese kann beispielsweise die Stabilität und/oder Aktivität des Target Proteins oder die Eigenschaften wie Bindung und Wirkung der oben genannten erfindungsgemäßen Inhibitoren sehr gezielt verbessern bzw. verändert werden.  
10

Beispielsweise wurde von Zhu et al. (Nature Biotech., Vol. 18, May 2000: 555 - 558) eine "site directed mutagenesis"-Methode in Pflanzen beschrieben, die vorteilhaft verwendet werden kann.  
15

Weiterhin können Veränderungen über die von Spee et al. (Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 3, 1993: 777- 78) beschriebenen PCR-Methode unter Verwendung von dITP zur zufälligen Mutagenese erzielt werden oder durch die von Rellos et al. (Protein Expr. Purif., 5, 1994 : 270-277) weiter verbesserte Methode.  
20

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung dieser veränderten Proteine und/oder von Nukleinsäuren ist eine von Stemmer et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 1994: 10747-10751) beschriebene "in vitro" Rekombinationstechnik für die molekulare Evolution oder die von Moore et al. (Nature Biotechnology Vol. 14, 1996: 458-467) beschriebene Kombination der PCR- und Rekombinationsmethode.  
25

Ein weiterer Weg zur Mutagenese von Proteinen wird von Greener et al. in Methods in Molecular Biology (Vol. 57, 1996: 375-385) beschrieben. In EP-A-0 909 821 wird eine Methode zur Veränderung von Proteinen unter Verwendung des Mikroorganismus E. coli XL-1 Red beschrieben. Dieser Mikroorganismus erzeugt bei der Replikation Mutationen in den eingeführten Nukleinsäuren und führt so zu einer Veränderung der genetischen Information. Über Isolierung der veränderten Nukleinsäuren bzw. der veränderten Proteine und Testung auf Resistenz lassen sich leicht vorteilhafte Nukleinsäuren und die durch sie kodierten Proteine identifizieren. Diese können dann nach Einbringen in Pflanzen dort die Resistenz ausprägen und so zur Resistenz gegen die Herbizide führen.  
30  
35

Weitere Methoden der Mutagenese und Selektion sind beispielsweise Methoden wie die in vivo Mutagenese von Samen oder Pollen und Selektion resistenter Allele in Anwesenheit der erfindungsgemäßen Inhibitoren, gefolgt von genetischer und molekularer Identifizierung des veränderten, resistenten Allels. Weiterhin die Mutagenese und  
40

Selektion von Resistenzen in der Zellkultur durch Vermehrung der Kultur in Anwesenheit von sukzessiv steigenden Konzentrationen der erfindungsgemäßen Inhibitoren. Dabei kann die Erhöhung der spontanen Mutationsrate durch chemische/physikalische mutagene Behandlung ausgenutzt werden. Wie vorgehend beschrieben lassen sich auch mit Mikroorganismen, die eine endogene oder rekombinante Aktivität der durch die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren codierten Proteine haben, und die gegenüber den erfindungsgemäß identifizierten Inhibitoren sensitiv sind, veränderte Gene isolieren. Die Anzucht der Mikroorganismen auf Medien mit steigenden Konzentration von erfindungsgemäßen Inhibitoren erlaubt die Selektion und Evolution von resistenten Varianten der erfindungsgemäßen Targets. Die Frequenz der Mutationen kann wiederum durch mutagene Behandlungen erhöht werden.

Daneben stehen Verfahren zur gezielten Veränderungen von Nukleinsäuren zur Verfügung (Zhu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96, 8768 - 8773 und Beethem et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 96, 8774 - 8778). Diese Methoden ermöglichen es, in den Proteinen solche Aminosäuren, die für die Bindung von Inhibitoren von Bedeutung sind, durch funktionell analoge Aminosäuren zu ersetzen, die jedoch die Bindung des Inhibitors verhindern.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist deshalb ein Verfahren zur Erstellung von Nukleinsäuresequenzen, welche für Genprodukte kodieren, die eine veränderte biologische Aktivität aufweisen, wobei die biologische Aktivität dahingegen verändert wurde, daß eine erhöhte Aktivität vorliegt. Unter erhöhter Aktivität ist eine gegenüber dem Ausgangsorganismus bzw. gegenüber dem Ausgangsgenprodukt um mindestens 10% , bevorzugt um mindestens 30%, besonders bevorzugt um mindestens 50%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 100% höhere Aktivität zu verstehen. Weiterhin kann die biologische Aktivität dahingegen verändert worden sein, daß die erfindungsgemäßen Substanzen und/oder Mittel nicht mehr oder nicht mehr richtig an die Nukleinsäuresequenzen und/oder die durch sie kodierten Genprodukte binden. Unter nicht mehr oder nicht mehr richtig ist im Sinne der Erfindung zu verstehen, daß die Substanzen um mindestens 30%, bevorzugt mindestens 50%, besonders bevorzugt um mindestens 70%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 80% oder gar nicht mehr an die veränderten Nukleinsäuren und/oder Genprodukte im Vergleich zum Ausgangsgenprodukt oder den Ausgangsnukleinsäuren binden.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft deshalb eine transgene Pflanze, welche mit einer Nukleinsäuresequenz, welche für ein Genprodukt kodiert, das eine veränderte biologische Aktivität aufweist, oder mit einer Nukleinsäuresequenz codierend für eine MDH -Variante transformiert wurde. Verfahren zur Transformation sind dem Fachmann

bekannt und beispielhaft weiter oben ausgeführt.

Genetisch veränderten transgene Pflanzen, die gegen die nach den erfindungsgemä-  
ßen Verfahren gefundenen Substanzen und/oder Mittel enthaltend diese Substanzen  
5 resistent sind, können auch durch Transformation gefolgt von Überexpression einer  
erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz erzeugt werden. Deshalb ist ein weiterer  
Erfindungsgegenstand ein Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen, die gegen  
Substanzen, die nach einem erfindungsgemäßen Verfahren gefunden wurden, resis-  
tent sind, dadurch gekennzeichnet, daß in diesen Pflanzen Nukleinsäuren codierend  
10 für eine Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH überexprimiert werden. Ein ähnliches  
Verfahren wird beispielhaft in Lermantova et al., Plant Physiol., 122, 2000: 75 - 83  
beschrieben.

Die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung resistenter  
15 Pflanzen ermöglichen die Entwicklung neuer Herbizide, die eine möglichst umfassende  
Pflanzenspezies unabhängige Wirkung aufweisen (sog. Totalherbizide), in Kombination  
mit der Entwicklung von gegenüber dem Totalherbizid resistenten Nutzpflanzen. Ge-  
genüber Totalherbiziden resistente Nutzpflanzen sind bereits verschiedentlich be-  
schrieben worden. Dabei können mehrere Prinzipien zur Erzielung einer Resistenz  
20 unterschieden werden:

- a) Resistenzерzeugung in einer Pflanze über Mutationsverfahren oder gentechni-  
sche Verfahren, indem das als Zielort für das Herbizid dienende Protein deutlich  
überproduziert wird und indem auf Grund des großen Überschusses des als  
25 Zielort für das Herbizid dienende Protein, die von diesem Protein in der Zelle  
ausgeübte Funktion auch nach Applikation des Herbizides beibehalten wird.
- b) Veränderung der Pflanze dahingehend, daß eine modifizierte Version des als  
Zielort des Herbizid fungierenden Proteins eingeführt wird und daß das neu ein-  
30 geführte modifizierte Protein vom Herbizid nicht in seiner Funktion beeinträchtigt  
wird.
- c) Veränderung der Pflanze dahingehend, daß ein neues Protein/ eine neue RNA  
eingeführt wird welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die für die herbizide  
35 Wirkung der niedermolekularen Substanz verantwortliche chemische Struktur des  
Proteins oder der Nukleinsäure wie der RNA oder der DNA so verändert wird,  
daß durch die veränderte Struktur keine herbizide Wirkung mehr entfaltet werden  
kann, daß heißt die Interaktion des Herbizids mit dem Zielort nicht mehr erfolgen  
40 kann.

- d) das die Funktion des Targets durch ein neues in die Pflanze eingebrachtes Gen ersetzt wird, und so ein sogenannter "alternativer Pathway" geschaffen wird.
- e) Das die Funktion des Targets durch ein anderes in der Pflanze vorhandenes Gen bzw. dessen Genprodukt übernommen wird.

Dem Fachmann sind alternative Verfahren zur Identifizierung von den homologen Nukleinsäuren beispielsweise in anderen Pflanzen mit ähnlichen Sequenzen wie beispielsweise unter Verwendung von Transposons, bekannt. Gegenstand dieser Erfindung ist daher auch die Verwendung von alternativen Insertionsmutageneseverfahren zur Insertion von fremder Nukleinsäuren in die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 in von diesen Sequenzen aufgrund des genetischen Codes abgeleitete Sequenzen und/oder deren Derivate in anderen Pflanzen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt mit einer der oben beschriebenen Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Expressionskassette nach ebenfalls oben beschriebenen gängigen Transformationsmethoden.

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten MDH-Variante kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung oder durch einen Keimungstest ermittelt werden.

Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH Gens Gens und deren Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hemmstoffen der Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden sollten.

#### Beispiel 1: Erzeugung einer cDNA-Bibliothek im Pflanzentransformationsvektor

Zur Erzeugung einer cDNA-Bibliothek (im folgenden "binäre cDNA-Bank" genannt) in einem Vektor, der direkt für die Transformation von Pflanzen verwendet werden kann, wurde mRNA aus verschiedenen Pflanzengeweben isoliert und mit dem TimeSaver cDNA Synthese Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Erststrangsynthese wurde mit T12-18 Oligonucleotiden nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Größenfraktionierung und Ligation von EcoRI-NotI-Adaptoren nach Herstellerangaben und Auffüllen der Überhänge mit Pfu DNA Polymerase (Stratagene) wurde die cDNA-Population normalisiert. Hierzu wurde

die Methode nach Kohci et al, 1995, Plant Journal 8, 771-776 vorgegangen, wobei die cDNA durch PCR mit dem Oligonukleotid N1 unter den in Tabelle 1 aufgeführten Bedingungen amplifiziert wurde.

5 Tabelle 1

Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklennummer
94	300	1
94	8	10
52	60	
72	180	
94	8	10
50	60	
72	180	
94	8	10
48	60	
72	180	
72	420	1

Das erhaltene PCR-Produkt wurde an die Säulenmatrix des PCR-Purification Kits (Qiagen, Hilden) gebunden und mit 300 mM NaP-Puffer, pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 0.04% SDS eluiert. Die DNA wurde 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend 24 Stunden bei 60°C renaturiert. 50µl der DNA wurden auf eine Hydroxylapatitsäule aufgetragen und diese 3 Mal mit 1 ml 10 mM NaP-Puffer, pH 6.8 gewaschen. Die gebundene Einzelstrang-DNA wurde mit 130 mM NaP-Puffer, pH 6.8 eluiert, mit Ethanol gefällt und in 40µl Wasser gelöst. Hiervon wurden 20µl für eine weitere PCR-Amplifikation wie oben beschrieben verwendet. Nach einer weiteren Anreicherung von ssDNA wurde eine dritte PCR-Amplifikation wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Herstellung des Pflanzentransformationsvektors zur Aufnahme der wie oben beschrieben hergestellten cDNA-Population erfolgte über Restriktionsenzym-Verdau des Vektor pUC18 mit SbfI und BamHI, Reinigung des Vektorfragment gefolgt von Auffüllen der Überhänge mit Pfu DNA Polymerase und Religation mit T4 DNA Ligase (Stratagene). Das so hergestellte Konstrukt wird im folgenden als pUC18SbfI- bezeichnet.

Der Vektor pBinAR wurde zunächst mit NotI gespalten, nach Auffüllen der Enden religiert, mit SbfI gespalten, nach Auffüllen der Enden religiert und im Anschluß mit EcoRI und HindIII gespalten. Das resultierende Fragment wurde in ein Derivat des binären Pflanzentransformationsvektors pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) Plant Mol Biol 25:989-994) ligiert, der eine Transformation von Pflanzen mittels Agrobakterium ermöglicht und eine Kanamycinresistenz in transgenen Pflanzen vermittelt.

telt, ligiert. Das hierbei erzeugte Konstrukt wird im folgenden als pSun12/35S bezeichnet.

pUC18Sbfl- wurde als Template für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit den Oligonucleotiden V1 und V2 (siehe Tabelle 2) und Pfu DNA Polymerase eingesetzt. Das resultierende Fragment wurde in den mit SmaI gespaltenen pSun12/35S ligiert, wodurch pSunblues2 erzeugt wurde. Nach Spaltung mit NotI, Dephosphorylierung mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) und Aufreinigung des Vektorfragmentes wurde pSunblues2 mit der normalisierten und ebenfalls mit NotI gespaltenen cDNA Population ligiert. Nach Transformation in E.coli XI-1blue (Stratagene) wurden die so erzeugte Klone in Mikrotiterplatten abgelegt. Die binäre cDNA-Bank enthält cDNAs in "Sense"- und in "Antisense"-Orientierung unter Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus 35s Promotors, die dementsprechend nach der Transformation in Tabakpflanzen zu "Cosuppressions"- und "Antisense"-Effekten führen können.

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Nukleinsäuresequenz
N1	5'-AGAATTCGCGGCCGCT-3' (SEQ ID NO:4)
V1 (PWL93not)	5'-CTCATGCGGCCGCGCGCAACGCAATTAATGTG-3' (SEQ ID NO:5)
V2 (pWL92)	5'-TCATGCGGCCGCGAGATCCAGTTCGATGTAAC-3' (SEQ ID NO:6)
G1 (35S)	5'-GTGGATTGATGTGATATCTCC-3' (SEQ ID NO:7)
G2 (OCS)	5'-GTAAGGATCTGAGCTACACAT-3' (SEQ ID NO:8)

#### Beispiel 2: Transformation und Analyse von Tabakpflanzen

Ausgewählte Klone der binären cDNA-Bank wurden in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 transformiert (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13(1984), 4777-4788) und unter Streptomycin/Spectinomycin-Selektion inkubiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN mit dem Klon nt002035041r wurde eine in YEB-Medium auf OD600 = 0.8-1.6 verdünnte Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petrischale mit der Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf Murashige-Skoog Medium (Physiol. Plant. 15(1962), 473) mit 2% Saccharose (2MS-Medium) mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50mg/l Kanamycin, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2mg/l Naphtyllessigsäure und 1,6g/l Glukose weitergeführt. Wachsende

Sprossen wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Regenerierte Sprossen wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten. Auf diese Weise wurden transgene Pflanzen der Linie E\_0000005869 erzeugt.

5

Die Integration der cDNA der Klone in das Genom der transgenen Linien wurde über PCR mit den Oligonukleotiden G1 und G2 (siehe Tabelle 2) und genomischer DNA, die aus den entsprechenden transgenen Linien präpariert wurde nachgewiesen. Hierzu wurde vorzugsweise TAKARA Taq-DNA Polymerase nach Herstellerangaben (MoBi-Tec, Göttingen) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der jeweils zur Transformation verwendete cDNA-Klon der binären cDNA-Bank als Template für eine PCR-Reaktion. PCR Produkte identischer Größe oder ggf. gleicher Spaltungsmuster, die nach Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen erhalten wurden, dienten als Nachweis der Integration der entsprechenden cDNA. Das Insert des Klons nt002035041r wurde auf diese Weise in den transgenen Pflanzen mit den oben genannten Phänotypen nachgewiesen.

Nach Transfer der Sprosse in Erde wurden die Pflanzen für 2-20 Wochen im Gewächshaus auf die Ausprägung von Phänotypen beobachtet. Dabei stellte sich heraus, dass transgene Pflanzen der Linie E\_0000005869, in welchen das Insert von nt002035041r nachgewiesen wurde, ähnliche Phänotypen aufwiesen. Diese Pflanzen zeigten nach 2 Wochen starke Wachstumsretardierungen, sowie chlorotische Blätter und vereinzelt Nekrosen.

### 25 Beispiel 3 Sequenzanalyse des Klones

Zu Isolierung einer Volle Länge cDNA-Sequenz von nt002035041r (SEQ ID NO:2) wurde das Smart-RACE kit (Clontech) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die SEQ ID NO:2 von 1513 bp Länge codiert auf einem offenen Leseramen (nt 148-1221) von 960 nt Länge für ein Protein von 320 Aminosäuren.

Hiermit wurde erstmalig und überraschend gezeigt, dass die natürliche Expression von glyoxysomalen MDH codierenden Sequenzen essenziell für Pflanzen ist und eine verringerte Expression zu Schädigungen entsprechend den unter Beispiel 2 aufgeführten Phänotypen führt. Daraus folgt, dass sich Malat Dehydrogenase, bevorzugt MDH als Target für Herbizide eignet.

Die größte Homologie findet sich zu glyoxysomalen MDHs aus Wassermelone (P19446, Swissprot) mit 77,5 % Identität auf Nukleotidebene (90,7% Ähnlichkeit bzw. 85,4% Identität auf Proteinebene), Gurke, Arabidopsis, Soja und Reis. Die N-termin-

40

nen 38 Aminosäuren stellen vermutlich eine glyoxysomale Transitsequenz dar.

#### Beispiel 4: Expression in E.coli

- 5 Zur Erzeugung aktiven Nt-MDH Proteins mit pflanzlicher MDH-Aktivität wurde die Codierregion von Nt-MDH sowie MDH aus Arabidopsis (Genbank: At2g22780) in E. coli Bakterien überexprimiert. Dazu wurden Nt-MDH-Fragmente mittels spezieller Oligonukleotide und Pfu-Ultra Polymerase (Stratagene) per PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pCR T7/CT TOPO (Invitrogen) ligiert (Konstrukte Nt1 und At1, 10 Tabelle 7). Auf diese Weise wurden codierte Fusionsproteine mit C-terminalen Hexahistidin-tag erzeugt. Bei der Klonierung wurde durch die Verwendung der angegebenen Oligonucleotide eine N-terminal verkürzte Version der MDH erzeugt, um die glyoxysomale Transitsequenz, die einer funktionellen Expression entgegenstehen könnte auszuschließen. Dabei wurde von der Transitsequenz der glyoxysomalen MDH aus Wassermelone ausgegangen (Gietl. Et al. 1996, BBA 1274, 48-58). Die PCR wurde nach 15 Standardbedingungen (z.B. nach Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press) in 36 Zyklen durchgeführt, wobei die Annealingtemperaturen zwischen 44 und 55°C lagen und für die Polymerisationszeit je 60sec pro 1000bp betrug. Die Template sowie die für die jeweiligen 20 Template verwendeten Primer sowie Annealingtemperaturen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7

Konstrukt	Annealing-Temp. [°C]	Primer (Nukleinsäuresequenz)
Nt-gMDH-E1 <sup>(1)</sup>	53	5'-ATGAGGGCGAAAGGGGG-3' (SEQ ID NO:9) 5'-TTTCTTTACAAAGTTGACACCCTTC-3' (SEQ ID NO:10)
At-gMDH-E1 <sup>(2)</sup>	56	5'-ATGCGGGCAAAGGTGG-3' (SEQ ID NO:11) 5'-TTTCTTCGCAAAGGTAACACC-3' (SEQ ID NO:12)

25

- (1) Templat: Nicotiana tabacum cDNA-Bank  
(2) Templat: Arabidopsis thaliana cDNA-Bank

30

Die in der PCR erhaltenen Produkte wurden in den Vektor pCR T7/CT TOP ligiert und in E. coli transformiert. Die Expression wurde in E. coli BL21(DE3) Stämmen wie BL21(DE3)pLysS oder BL21(DE3)pLysE (Invitrogen), BL21-CodonPlus(DE3) oder BL21-CodonPlus(DE3)RIL (Stratagene) nach Induktion mit IPTG durchgeführt. Dazu



wurde nach Standardprotokollen (Invitrogen) vorgegangen.

- 5 Die Expressionsprodukte Nt-gMDH-E1 und At-gMDH-E1 wurden über Ni-Agarose affinitätschromatographisch aufgereinigt. Hierzu wurde nach Herstellerangaben (Qia-gen) vorgegangen.

#### Beispiel 5: in vitro Testsysteme

- 10 Die Enzymaktivität der gMDH kann nach Huang et al. (1974, Plant Physiol 54, 364-368) aus Präparationen pflanzlicher Microbodies gemessen werden. Es bietet sich jedoch an, die wie oben beschreiben in E.coli exprimierten und aufgereinigten Proteine einzusetzen, um Hintergrundaktivitäten cytosolischer und Mitochondrialer MDHs zu minimieren.
- 15 Die Messung der enzymatischen Aktivität der gMDH aus Beispiel 3 wurde über die Umsetzung von NAD<sup>+</sup> zu NADH erfolgte photometrisch bei 340nm nach Gietl et al. (1996, BBA 1274, 48-58). Dieser Assay kann im Mikrotiterplatten Maßstab durchgeführt werden.

## Patentansprüche

1. Verwendung von Malat Dehydrogenase in einem Verfahren zur Identifizierung von Herbiziden.
- 5
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Malat Dehydrogenase durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, welche:
- 10
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- 15
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder
- 20
- c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% aufweist, ableiten lässt;
- umfasst.
- 25
3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Malat Dehydrogenase um eine glyoxysomalen Malat Dehydrogenase handelt, welche durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird umfassend:
- 30
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- b) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- 35
- c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lässt; oder
- 40
- d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID

NO:3 von mindestens 66% aufweist, ableiten läßt.

- 5
4. Pflanzliche Nukleinsäuresequenzen kodierend für eine glyoxysomalen Malat Dehydrogenase umfassend:
- 10
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- 15
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:3 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- 20
- c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:2 mit einer Identität von mindestens 79% zu der SEQ ID NO:2; oder
- d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 87% aufweist, ableiten läßt.
- 25
5. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase als Target für Herbizide kodiert von einem Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 4.
- 30
6. Verfahren zur Detektion funktioneller Analoga der SEQ ID NO:2
- a) durch Herstellung einer Sonde gefolgt von anschließenden Durchsuchen einer genomischen oder cDNA Bank der entsprechenden Spezies; oder
- b) einer Computer-Recherche nach analogen Sequenzen in elektronischen Datenbanken.
- 35
7. Expressionskassette umfassend
- 40
- a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 4; oder
- b) zusätzliche Funktionselemente; oder

- c) eine Kombination aus a) und b).
8. Vektor umfassend eine Expressionskassette nach Anspruch 7.
- 5 9. Transgener Organismus umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase gemäß Anspruch 4, eine Expressionskassette gemäß Anspruch 7 oder einen Vektor gemäß Anspruch 8 ausgewählt aus Bakterien, Hefen, Pilzen, tierischen oder pflanzlichen Zellen.
- 10 10. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung umfassend die folgenden Schritte:
- 15 i. Inkontaktbringen von Malat Dehydrogenase mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen, die die Bindung der Testverbindung(en) an das Nukleinsäuremolekül oder an die glyoxysomalen Malat Dehydrogenase erlauben; und
- 20 ii. Nachweis, ob die Testverbindung an die Malat Dehydrogenase aus i) bindet; oder
- iii. Nachweis, ob die Testverbindung die enzymatische oder biologische Aktivität der Malat Dehydrogenase aus i) reduziert oder blockiert; oder
- 25 iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression der Malat Dehydrogenase aus i) reduziert oder blockiert.
11. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass die Malat Dehydrogenase durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, welche
- 30 a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 4; oder
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% aufweist, ableiten läßt;
- 35 umfasst.
- 40 12. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass die Malat Dehydrogenase eine glyoxysomale Malat Dehydrogenase ist und durch eine Nukleinsäure-

resequenz kodiert wird, welche

- a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 4; oder
- 5 b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 66% aufweist, ableiten läßt;
- 10 umfasst.
13. Verfahren nach Anspruch 10, 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine Testverbindung selektiert wird, welche die enzymatische oder biologische Aktivität der glyoxysomalen Malat Dehydrogenase reduziert oder blockiert.
- 15 14. Verfahren nach Anspruch 10, 11, 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass
- i. Malat Dehydrogenase entweder in einem transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß Malat Dehydrogenase enthält, kultiviert wird;
- 20 ii. die Malat Dehydrogenase aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und
- 25 iii. eine Testverbindung selektiert wird, welche die enzymatische Aktivität der Malat Dehydrogenase aus Schritt a) reduziert oder blockiert.
- 30 15. Verfahren nach Anspruch 10, 11, 12, 13 oder 14 dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Schritte umfasst:
- i. Herstellung eines transgenen Organismus nach Anspruch 7 oder eines transgenen Organismus enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Malat Dehydrogenase umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% ableiten läßt;
- 35 40 wobei in dem transgenen Organismus Malat Dehydrogenase überexprimiert wird;

- ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf den transgenen Organismus nach i) und auf einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps; und
- 5      iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testsubstanz; und
- 10      iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein vermindertes Wachstum oder eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus.
- 15      16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass es in einem pflanzlichen Organismus, einem Cyanobakterium oder einem Proteobakterium durchgeführt wird.
- 20      17. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Schritte umfasst:
  - 25      i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer glyoxysomalen Malat Dehydrogenase umfassend
    - a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 4; oder
    - 30      b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% aufweist, ableiten läßt;
  - 35      ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;
  - 40      iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und
  - 40      iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transge-

nen Pflanze.

- 5 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Substanzen in einem High-Throughput-Screening durchgeführt wird.
- 10 19. Träger, der eines oder mehrere der Nukleinsäuremoleküle nach Anspruch 4, oder eine oder mehrere Expressionskassetten nach Anspruch 7, einen oder mehrere Vektoren nach Anspruch 8, einen oder mehrere Organismen nach Anspruch 9 oder eines oder mehrere (Poly)peptide nach Anspruch 5 aufweist.
- 15 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Substanzen in einem High-Throughput-Screening durchgeführt wird unter Verwendung eines Trägers gemäß Anspruch 19.
21. Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert über eines der Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16, 18 und 20.
- 20 22. Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung identifiziert über das Verfahren nach Anspruch 17, 18 oder 20.
- 25 23. Verfahren zur Herstellung einer agrochemischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man
- 30 a) eine Verbindung mit herbizider Wirkung über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 10 bis 16, 18 und 20 oder eine Verbindung mit wachstumsregulatorischer Wirkung nach Anspruch 17, 18 oder 20 identifiziert; und
- b) diese Verbindung zusammen mit geeigneten Hilfsmitteln zu Pflanzenschutzmitteln mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung formuliert.
- 35 24. Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder zur Regulation des Wachstums von Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens einen Inhibitor der Malat-Dehydrogenase gemäß Anspruch 21 oder 22 oder eine agrochemische Zusammensetzung enthaltend einen Inhibitor der Malat-Dehydrogenase gemäß Anspruch 21 oder 22 auf Pflanzen, deren Lebensraum und/oder auf Samen einwirken läßt.
- 40 25. Verwendung eines Inhibitor der Malat-Dehydrogenase gemäß Anspruch 21 oder 22 oder einer agrochemische Zusammensetzung enthaltend einen Inhibitor der

Malat-Dehydrogenase gemäß Anspruch 21 oder 22 in einem Verfahren nach Anspruch 24.

- 5 26. Verfahren zur Erzeugung von Nukleinsäuresequenzen, welche für Malat Dehydrogenase kodieren, die durch Substanzen nach Anspruch 21 nicht inhibiert wird, wobei die Nukleinsäuresequenz eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% aufweist, ableiten läßt;
- 10
- dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Prozessschritte umfaßt:
- 15 a) Expression des von der Nukleinsäuresequenz gemäß i) kodierten Proteins in einem heterologen System oder in einem zellfreien System;
- b) Randomisierte oder gerichtete Mutagenese des Proteins durch Modifikation der Nukleinsäure;
- 20 c) Messung der Interaktion des veränderten Genprodukts mit dem Herbizid;
- d) Identifizierung von Derivaten des Proteins die eine geringere Interaktion aufweisen;
- 25 e) Testung der biologischen Aktivität des Proteins nach Applikation des Herbizides; und
- f) Auswahl der Nukleinsäuresequenzen, die eine veränderte biologische Aktivität gegenüber dem Herbizid aufweisen.
- 30 27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die gemäß Anspruch 26 f) ausgewählten Sequenzen in einen Organismus eingebracht werden.
28. Verfahren zur Erzeugung transgener Pflanzen, die gegen Substanzen nach Anspruch 21 resistent sind, dadurch gekennzeichnet, daß in diesen Pflanzen eine
- 35 Nukleinsäuresequenz codierend für eine Malat Dehydrogenase, welche
- a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 4; oder
- b) ein funktionelles Äquivalente der Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO:3, das eine Identität mit der SEQ ID NO:3 von mindestens 63% aufweist; oder
- 40



umfasst, überexprimiert wird.

29. Transgene Pflanze hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 28.

## SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft  
 5 <120> Malat Dehydrogenase als Target für Herbizide  
 <130> PF 0000 054200  
 10 <160> 12  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 673  
 15 <212> DNA  
 <213> Nicotiana tabacum  
 <400> 1  
 20 gcggccgcta aacctccttg ttcttttacg ccagaggaag ctgaatattt aacatctcgt 60  
 atacaaaatg ggggaactga agttgttgag gcaaaagctg gtgctgggtc ggcaactctc 120  
 tctatggcat atgctgcggt taaatttgcc gacgcatgtt tgcattggatt gagaggagat 180  
 25 gctggcattg tagaatgtgc ctttgtgtct tctcaggtga ctgaacttcc atttttcgca 240  
 tcaaaagtat ggcttggccg caacggagtt gaagaaatat acccccttgg tcccctaaat 300  
 gaatacgaga ggtctgggct tgagaaggca aggaaagagt tggcaacaag tgttcagaag 360  
 30 ggtgtcaact ttgtaaagaa atgagcagac agctacatga cttccaaaag atgcttttat 420  
 gtgggctata tatctcaaat ccgcagttcc agaaaataag agtagtttct ttcttgtatt 480  
 35 aaagggcaaa tcctgttcta attttctata gattgatgcc ttggtgcaga aaataaatgt 540  
 actatttggt catctaaaat aacaacagtc ccagtgcat gttggacttg caaagtatta 600  
 catcctttga agcaagggtc tgttatggac tttttgacag tatggatatt taaagggtc 660  
 40 ggagagcggc cgc 673  
 <210> 2  
 45 <211> 1505  
 <212> DNA  
 <213> Nicotiana tabacum  
 <220>  
 50 <221> CDS  
 <222> (148)..(1221)  
 <223>  
 55 <400> 2  
 ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg ggggggaaac 60  
 aaaattcaat tacttacctt gatttctact acctctcttt ctcatcataa ttcaaacaca 120  
 60 caaattctca agcccaagtc ttagaat atg cag aac ggt gca gag acc tat cga 174  
 Met Gln Asn Gly Ala Glu Thr Tyr Arg  
 1 5  
 cga atg gcc acc atc tca gct cac ctt aac ccc tct cct tct tct cat 222

	Arg	Met	Ala	Thr	Ile	Ser	Ala	His	Leu	Asn	Pro	Ser	Pro	Ser	Ser	His	
	10					15					20					25	
5	cag	atg	gag	gga	ggt	gtg	ggt	ttg	agc	cga	gct	aat	tgc	agg	gcg	aaa	270
	Gln	Met	Glu	Gly	Gly	Val	Gly	Leu	Ser	Arg	Ala	Asn	Cys	Arg	Ala	Lys	
					30					35					40		
10	ggg	ggt	tct	cca	gga	ttc	aaa	gtc	gcg	atc	ttg	ggt	gct	gca	gga	ggt	318
	Gly	Gly	Ser	Pro	Gly	Phe	Lys	Val	Ala	Ile	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	
				45					50					55			
15	att	ggt	cag	cca	ctt	gct	atg	ctt	atg	aaa	acg	aat	cca	ctg	gtt	tca	366
	Ile	Gly	Gln	Pro	Leu	Ala	Met	Leu	Met	Lys	Thr	Asn	Pro	Leu	Val	Ser	
			60					65					70				
	gtt	ctg	cat	ctt	tat	gat	gtt	gcc	aat	act	cct	ggt	gta	act	gct	gac	414
	Val	Leu	His	Leu	Tyr	Asp	Val	Ala	Asn	Thr	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Asp	
		75					80					85					
20	att	agc	cac	atg	gac	act	ggt	gcc	gtg	gta	cgt	ggt	ttt	cta	ggg	cct	462
	Ile	Ser	His	Met	Asp	Thr	Gly	Ala	Val	Val	Arg	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	
	90					95					100					105	
25	caa	caa	ttg	gaa	gat	gct	ctc	act	ggc	atg	gac	ctt	gta	ata	atc	cct	510
	Gln	Gln	Leu	Glu	Asp	Ala	Leu	Thr	Gly	Met	Asp	Leu	Val	Ile	Ile	Pro	
					110					115					120		
30	gct	ggt	gtt	cct	aga	aaa	cca	ggc	atg	aca	aga	gat	gat	ctt	ttc	aac	558
	Ala	Gly	Val	Pro	Arg	Lys	Pro	Gly	Met	Thr	Arg	Asp	Asp	Leu	Phe	Asn	
				125					130					135			
35	atc	aat	gca	gga	att	gtg	agg	act	tta	tgt	gaa	gga	att	gcc	aag	tgc	606
	Ile	Asn	Ala	Gly	Ile	Val	Arg	Thr	Leu	Cys	Glu	Gly	Ile	Ala	Lys	Cys	
		140						145					150				
	tgt	cct	aag	gcc	att	gtt	aac	ata	att	agt	aat	cct	gtt	aac	tct	aca	654
	Cys	Pro	Lys	Ala	Ile	Val	Asn	Ile	Ile	Ser	Asn	Pro	Val	Asn	Ser	Thr	
		155					160					165					
40	gta	cca	att	gct	gca	gag	gtt	ttc	aag	aag	gct	ggc	acc	ttt	gat	ccg	702
	Val	Pro	Ile	Ala	Ala	Glu	Val	Phe	Lys	Lys	Ala	Gly	Thr	Phe	Asp	Pro	
	170					175					180					185	
45	agg	aga	ctg	ttg	ggc	gtg	aca	atg	ctt	gat	att	gtc	aga	gcc	aat	aca	750
	Arg	Arg	Leu	Leu	Gly	Val	Thr	Met	Leu	Asp	Ile	Val	Arg	Ala	Asn	Thr	
					190					195					200		
50	ttt	gtg	gct	gaa	gtt	ttg	ggg	ctt	gat	cct	agg	gaa	gtg	gat	gtt	cca	798
	Phe	Val	Ala	Glu	Val	Leu	Gly	Leu	Asp	Pro	Arg	Glu	Val	Asp	Val	Pro	
				205					210					215			
55	gtt	gtg	ggg	ggt	cat	gct	ggc	gtt	aca	att	cta	cct	ctt	ctt	tcc	cag	846
	Val	Val	Gly	Gly	His	Ala	Gly	Val	Thr	Ile	Leu	Pro	Leu	Leu	Ser	Gln	
			220					225					230				
	gtt	aaa	cct	cct	tgt	tct	ttt	acg	cca	gag	gaa	act	gaa	tat	tta	aca	894
	Val	Lys	Pro	Pro	Cys	Ser	Phe	Thr	Pro	Glu	Glu	Thr	Glu	Tyr	Leu	Thr	
		235					240					245					
60	tct	cgt	ata	caa	aat	ggg	gga	act	gaa	gtt	gtt	gag	gca	aaa	gct	ggt	942
	Ser	Arg	Ile	Gln	Asn	Gly	Gly	Thr	Glu	Val	Val	Glu	Ala	Lys	Ala	Gly	
	250					255					260					265	
	gct	ggt	tcg	gca	act	ctc	tct	atg	gca	tat	gct	gcg	gtt	aaa	ttt	gcc	990

Ala Gly Ser Ala Thr Leu Ser Met Ala Tyr Ala Ala Val Lys Phe Ala  
 270 275 280

5 gac gca tgt ttg cat gga ttg aga gga gat gct ggc att gta gaa tgt 1038  
 Asp Ala Cys Leu His Gly Leu Arg Gly Asp Ala Gly Ile Val Glu Cys  
 285 290 295

10 gcc ttt gtg tct tct cag gtg act gaa ctt cca ttt ttc gca tca aaa 1086  
 Ala Phe Val Ser Ser Gln Val Thr Glu Leu Pro Phe Phe Ala Ser Lys  
 300 305 310

15 gta cgg ctt ggc cgc aac gga gtt gaa gaa ata tac ccc ctt ggt ccc 1134  
 Val Arg Leu Gly Arg Asn Gly Val Glu Glu Ile Tyr Pro Leu Gly Pro  
 315 320 325

cta aat gaa tac gag agg tct ggg ctt gag aag gca aag aaa gag ctg 1182  
 Leu Asn Glu Tyr Glu Arg Ser Gly Leu Glu Lys Ala Lys Lys Glu Leu  
 330 335 340 345

20 gca aca agt gtt cag aag ggt gtc aac ttt gta aag aaa tgagcagaca 1231  
 Ala Thr Ser Val Gln Lys Gly Val Asn Phe Val Lys Lys  
 350 355

25 gctacatgac ttccaaaaga tgcttttatg tgggctatat atctcaaate cgcagttcca 1291  
 gaaaataaga gtagtttctt tcttgtatta aaggggcaaat cctgttctaa ttttctatag 1351  
 attgatgcct tgggtgcagaa aataaatgta ctatttggtc atctaaaata acaacagtcc 1411

30 ccagtgcattg ttggacttgc aaagtattac atcctttgaa gcaagggctt gttatggact 1471  
 ttttgacagt atggatattt aaagggcttg gaga 1505

35 <210> 3  
 <211> 358  
 <212> PRT  
 <213> Nicotiana tabacum

40 <400> 3

Met Gln Asn Gly Ala Glu Thr Tyr Arg Arg Met Ala Thr Ile Ser Ala  
 1 5 10 15

45 His Leu Asn Pro Ser Pro Ser Ser His Gln Met Glu Gly Gly Val Gly  
 20 25 30

50 Leu Ser Arg Ala Asn Cys Arg Ala Lys Gly Gly Ser Pro Gly Phe Lys  
 35 40 45

55 Val Ala Ile Leu Gly Ala Ala Gly Gly Ile Gly Gln Pro Leu Ala Met  
 50 55 60

60 Leu Met Lys Thr Asn Pro Leu Val Ser Val Leu His Leu Tyr Asp Val  
 65 70 75 80

Ala Asn Thr Pro Gly Val Thr Ala Asp Ile Ser His Met Asp Thr Gly  
 85 90 95

Ala Val Val Arg Gly Phe Leu Gly Pro Gln Gln Leu Glu Asp Ala Leu  
100 105 110

5 Thr Gly Met Asp Leu Val Ile Ile Pro Ala Gly Val Pro Arg Lys Pro  
115 120 125

10 Gly Met Thr Arg Asp Asp Leu Phe Asn Ile Asn Ala Gly Ile Val Arg  
130 135 140

15 Thr Leu Cys Glu Gly Ile Ala Lys Cys Cys Pro Lys Ala Ile Val Asn  
145 150 155 160

Ile Ile Ser Asn Pro Val Asn Ser Thr Val Pro Ile Ala Ala Glu Val  
165 170 175

20 Phe Lys Lys Ala Gly Thr Phe Asp Pro Arg Arg Leu Leu Gly Val Thr  
180 185 190

25 Met Leu Asp Ile Val Arg Ala Asn Thr Phe Val Ala Glu Val Leu Gly  
195 200 205

30 Leu Asp Pro Arg Glu Val Asp Val Pro Val Val Gly Gly His Ala Gly  
210 215 220

35 Val Thr Ile Leu Pro Leu Leu Ser Gln Val Lys Pro Pro Cys Ser Phe  
225 230 235 240

Thr Pro Glu Glu Thr Glu Tyr Leu Thr Ser Arg Ile Gln Asn Gly Gly  
245 250 255

40 Thr Glu Val Val Glu Ala Lys Ala Gly Ala Gly Ser Ala Thr Leu Ser  
260 265 270

45 Met Ala Tyr Ala Ala Val Lys Phe Ala Asp Ala Cys Leu His Gly Leu  
275 280 285

50 Arg Gly Asp Ala Gly Ile Val Glu Cys Ala Phe Val Ser Ser Gln Val  
290 295 300

55 Thr Glu Leu Pro Phe Phe Ala Ser Lys Val Arg Leu Gly Arg Asn Gly  
305 310 315 320

Val Glu Glu Ile Tyr Pro Leu Gly Pro Leu Asn Glu Tyr Glu Arg Ser  
325 330 335

60 Gly Leu Glu Lys Ala Lys Lys Glu Leu Ala Thr Ser Val Gln Lys Gly  
340 345 350

Val Asn Phe Val Lys Lys  
355

5  
    <210> 4  
    <211> 16  
    <212> DNA  
    <213> Artificial Sequence

10  
    <220>  
    <223> Primer

15  
    <400> 4  
    agaattcgcg gccgct 16

20  
    <210> 5  
    <211> 32  
    <212> DNA  
    <213> Artificial Sequence

25  
    <220>  
    <223> Primer

30  
    <400> 5  
    ctcatgcggc cgcgcgcaac gcaattaatg tg 32

35  
    <210> 6  
    <211> 32  
    <212> DNA  
    <213> Artificial Sequence

40  
    <220>  
    <223> Primer

45  
    <400> 6  
    tcatgcggcc gcgagatcca gttcgatgta ac 32

50  
    <210> 7  
    <211> 21  
    <212> DNA  
    <213> Artificial Sequence

55  
    <220>  
    <223> Primer

60  
    <400> 7  
    gtggattgat gtgatatctc c 21

65  
    <210> 8  
    <211> 21  
    <212> DNA  
    <213> Artificial Sequence

70  
    <220>  
    <223> Primer

75  
    <400> 8  
    gtaaggatct gagctacaca t 21

5      <210> 9  
      <211> 17  
      <212> DNA  
      <213> Artificial Sequence  
      <220>  
      <223> Primer  
10     <400> 9  
      atgagggcga aaggggg  
17  
15     <210> 10  
      <211> 25  
      <212> DNA  
      <213> Artificial Sequence  
      <220>  
20     <223> Primer  
      <400> 10  
      tttctttaca aagttgacac ccttc  
25  
      <210> 11  
      <211> 17  
      <212> DNA  
      <213> Artificial Sequence  
30     <220>  
      <223> Primer  
      <400> 11  
35     atgcgggcaa aaggtgg  
17  
40     <210> 12  
      <211> 21  
      <212> DNA  
      <213> Artificial Sequence  
      <220>  
45     <223> Primer  
      <400> 12  
      tttcttcgca aaggtaacac c  
21  
50

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/E 8/14379

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/02 G01N33/50 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FASKE MARIA ET AL: "Transgenic tobacco plants expressing pea chloroplast Nmdh cDNA in sense and antisense orientation. Effects on NADP-malate dehydrogenase level, stability of transformants and plant growth" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 115, no. 2, 1997, pages 705-715, XP0001181047 &amp; ISSN: 0032-0889 cited in the application page 713, right-hand column, paragraph 2; tables 1,2</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	1,10,13, 14,18,20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 May 2004

Date of mailing of the international search report

28/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lanzrein, M



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/E 8/14379

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>KIM DAE-JAE ET AL: "Expression of a single gene encoding microbody NAD-malate dehydrogenase during glyoxysome and peroxisome development in cucumber"  PLANT MOLECULAR BIOLOGY,  vol. 26, no. 6, 1994, pages 1833-1841,  XP0009029821  &amp; ISSN: 0167-4412  page 1835, left-hand column, paragraph 2;  figure 2</p>	4-9, 19
Y	<p>GIETL C: "GLYOXYSOMAL MALATE DEHYDROGENASE FROM WATERMELON IS SYNTHESIZED WITH AN AMINO-TERMINAL TRANSIT PEPTIDE"  PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA,  vol. 87, no. 15, 1990, pages 5773-5777,  XP002278199  &amp; ISSN: 0027-8424  figures 1,3</p>	4-9, 19
A	<p>KATO AKIRA ET AL: "Glyoxysomal malate dehydrogenase in pumpkin: Cloning of a cDNA and functional analysis of its presequence"  PLANT AND CELL PHYSIOLOGY,  vol. 39, no. 2, February 1998 (1998-02),  pages 186-195, XP0009029820  &amp; ISSN: 0032-0781  figure 1</p>	4-9, 19
A	<p>GOODMAN M M ET AL: "MALATE DEHYDROGENASE: VIABILITY OF CYTOSOLIC NULLS AND LETHALITY OF MITOCHONDRIAL NULLS IN MAIZE"  PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA,  vol. 78, no. 3, 1981, pages 1783-1785,  XP002278201  &amp; ISSN: 0027-8424  table 2</p>	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/14379

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 21-29  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of I.2

Claims: 21-29

The current claims 21-29 relate to herbicidal compounds, but no structural characterization thereof is given in the claims or in the description. These hypothetical compounds are therefore not supported by the description (PCT Article 6), nor are they adequately disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, Part C, VI, 8.5) if the deficiencies that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP/14379

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N9/02 G01N33/50 C12N15/82

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EMBL

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FASKE MARIA ET AL: "Transgenic tobacco plants expressing pea chloroplast Nmdh cDNA in sense and antisense orientation. Effects on NADP-malate dehydrogenase level, stability of transformants and plant growth" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), Bd. 115, Nr. 2, 1997, Seiten 705-715, XP0001181047 & ISSN: 0032-0889 in der Anmeldung erwähnt Seite 713, rechte Spalte, Absatz 2; Tabellen 1,2  ----- -/--	1,10,13, 14,18,20

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Mai 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/05/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lanzrein, M

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KIM DAE-JAE ET AL: "Expression of a single gene encoding microbody NAD-malate dehydrogenase during glyoxysome and peroxisome development in cucumber" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 26, Nr. 6, 1994, Seiten 1833-1841, XP0009029821 & ISSN: 0167-4412 Seite 1835, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 2	4-9, 19
Y	GIETL C: "GLYOXYSOMAL MALATE DEHYDROGENASE FROM WATERMELON IS SYNTHESIZED WITH AN AMINO-TERMINAL TRANSIT PEPTIDE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, Bd. 87, Nr. 15, 1990, Seiten 5773-5777, XP002278199 & ISSN: 0027-8424 Abbildungen 1,3	4-9, 19
A	KATO AKIRA ET AL: "Glyoxysomal malate dehydrogenase in pumpkin: Cloning of a cDNA and functional analysis of its presequence" PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, Bd. 39, Nr. 2, Februar 1998 (1998-02), Seiten 186-195, XP0009029820 & ISSN: 0032-0781 Abbildung 1	4-9, 19
A	GOODMAN M M ET AL: "MALATE DEHYDROGENASE: VIABILITY OF CYTOSOLIC NULLS AND LETHALITY OF MITOCHONDRIAL NULLS IN MAIZE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, Bd. 78, Nr. 3, 1981, Seiten 1783-1785, XP002278201 & ISSN: 0027-8424 Tabelle 2	1

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 21-29  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 21-29

Die geltenden Patentansprüche 21-29 beziehen sich auf Verbindungen mit herbizider Wirkung ohne dass irgend eine strukturelle Charakterisierung in den Ansprüchen oder der Beschreibung gegeben wird. Diese hypothetischen Verbindungen sind deshalb nicht im Sinne von Artikel 6 PCT auf die Beschreibung gestützt und sind nicht im Sinne von Artikel 5 PCT in der Patentanmeldung genügend offenbart. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Masse, dass eine sinnvolle Recherche unmöglich erscheint.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit, der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.